

KERATAN SULFATE OLIGOSACCHARIDE FRACTION AND DRUG CONTAINING THE SAME**Publication number:** WO9616973**Publication date:** 1996-06-06**Inventor:** MARUYAMA HIROSHI (JP); MORIKAWA KIYOSHI (JP); TAWADA AKIRA (JP); MIYAUCHI SATOSHI (JP); YOSHIDA KEIICHI (JP); ASARI AKIRA (JP)**Applicant:** SEIKAGAKU KOGYO CO LTD (JP); MARUYAMA HIROSHI (JP); MORIKAWA KIYOSHI (JP); TAWADA AKIRA (JP); MIYAUCHI SATOSHI (JP); YOSHIDA KEIICHI (JP); ASARI AKIRA (JP)**Classification:****- international:** A61K31/737; C07H11/00; C07H13/04; C08B37/00; C12P19/26; A61K31/737; C07H11/00; C07H13/00; C08B37/00; C12P19/00; (IPC1-7): C07H11/00; A61K31/70**- european:** A61K31/70J; A61K31/70L5; A61K31/737; C07H11/00; C07H13/04C; C08B37/00P2; C12P19/26**Application number:** WO1995JP02386 19951122**Priority number(s):** JP19940298298 19941201**Also published as:**

- EP0795560 (A1)
- US6159954 (A1)
- US5939403 (A1)
- EP0795560 (A4)
- EP0795560 (B1)

[more >>](#)**Cited documents:**

- JP7278203
- WO9428889

[Report a data error here](#)**Abstract of WO9616973**

A keratan sulfate oligosaccharide comprising a di- to penta-saccharide which has a sulfated N-acetylglucosamine at the reducing end and wherein at least two hydroxyl groups per molecule have been sulfated, preferably one containing a disaccharide of the formula Gal(6S)-G1cNAc(6S) (wherein Gal, G1cN, Ac and 6S represent, respectively, galactose, glucosamine, acetyl and 6-O-sulfate) as the constituent; and antiphlogistic agent, antiallergic agent, immunoregulator, cell differentiation inducer and apoptosis inducer each containing the above oligosaccharide and/or a pharmaceutically acceptable salt thereof as the active ingredient.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP) 再公表特許 (A1) WO 96/16973
 (11) 国際公開番号
 発行日 平成9年(1997)12月22日 (43) 国際公開日 平成8年(1996)6月6日
 (51) IntCl. C07H 11/00 領別記号 特許登録番号 A61K 31/70

[特許請求の範囲]

- ケラタン硫酸オリゴ糖及び／又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する抗炎症剤。

- シアル酸及び／又はフコースを含みうる硫酸化されたN-アセチルラクトサミン単位を有するケラタン硫酸オリゴ糖及び／又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する抗炎症剤。

- 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、硫酸化されたN-アセチルグルコサミンを還元末端に有する2～5糖単位のオリゴ糖であつて、1分子中の少なくとも2個所の水酸基が硫酸化されたケラタノ硫酸オリゴ糖である請求項1又は2記載の抗炎症剤。

- 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、少なくとも下記式で表される二糖を構成成分として含むことを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の抗炎症剤。

- 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、少なくとも下記式で表される二糖を構成成分として含むことを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の抗炎症剤。

Gal(6S)-GlcNAc(6S)
(式中、Galはガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、Acはアセチル基を、GSは6-O-硫酸エーステルをそれぞれ表す。)

- 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、式(1)で表わされる四硫酸化N-アセチルラクトサミン四糖、式(II)で表される三硫酸化N-アセチルラクトサミン五糖、式(III)で表される二硫酸化N-アセチルラクトサミン二糖から選ばれることを特徴とする請求項4記載の抗炎症剤。

- Gal(6S) β -1-4GlcNAc(6S) β -1-3Gal(6S) β -1-4GlcNAc(6S)
NeuAc～Gal β -1-4GlcNAc(6S) β -1-3Gal(6S) β -1-4GlcNAc(6S)
Gal(6S) β -1-4GlcNAc(6S)
(式中、Galはガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、NeuAcはノイラミン酸を、Acはアセチル基を、GSは6-O-硫酸エーステルをそれぞれ表す。また、～は α 、 β 結合又は α 、 β 結合を表す。)

- ケラタン硫酸オリゴ糖及び／又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する抗アレルギー剤。

- シアル酸及び／又はフコースを含みうる硫酸化されたN-アセチルラクトサミン単位を有するケラタン硫酸オリゴ糖及び／又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する抗炎症剤。

- シアル酸及び／又はフコースを含みうる硫酸化されたN-アセチルラクトサミン単位を有するケラタン硫酸オリゴ糖及び／又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する抗炎症剤。

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 70 頁)	71) 出願人 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号
(2) 国際出願番号 PCT/JP95/02386 (22) 国際出願日 平成7年(1995)11月22日	(72) 発明者 丸山 造 東京都あきる野市引田889-14
(31) 優先権主張番号 特願平6-298298 (32) 優先日 平6(1994)12月1日	(72) 発明者 森川 清志 東京都西多摩郡日の出町大字平井2196-483
(33) 優先権主張国 日本 (JP) (34) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, AU, CA, CN, HU, JP, KR, RU, US)	(72) 発明者 多知田 男 埼玉県深谷市北入曽536-29 (72) 発明者 宮内 譲 東京都武藏村山市三ツ木5-5-6 (74) 代理人 神理士 渡山 勉 (外2名)
最終日に記入	
(54) [発明の名稱] ケラタン硫酸オリゴ糖及びそれを含む薬剤	
(57) [要約] 硫酸化されたN-アセチルグルコサミンを還元末端に有する2～5糖単位のオリゴ糖であつて、1分子中の少なくとも2個所の水酸基が硫酸化されたケラタノ硫酸オリゴ糖、好ましくは、その構成成分としてGal(6S)-GlcNAc(6S) (ただし、Galはガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、Acはアセチル基を、GSは6-O-硫酸エーステルをそれぞれ表す。) で表される二糖を含むケラタン硫酸オリゴ糖及び／又はその薬学的に許容される塩を抗炎症剤、抗アレルギー剤、免疫調節剤、細胞の分化誘導剤、アボトーシス系導剤の有効成分とする。	

トミン単位を行するケラタン硫酸オリゴ糖及び／又はその類学的に許容される量を有効成分として含有する抗アレルギー剤。

8. 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、硫酸化されたN-アセチルグルコサミンを還元末端に有する2～5糖単位のオリゴ糖であって、1分子中の少なくとも2個所の水酸基が硫酸化されたケラタン硫酸オリゴ糖である請求項1又は1-2瓶瓶の免疫調節剤。

9. 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、少なくとも下記式で表される二糖を構成成分として含むことを特徴とする請求項1～13のいずれか1項記載の免疫調節剤。

(式中、Galはガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、Acはアセチル基を、GSは6-O-硫酸エステルをそれぞれ表す。)

1.0. 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、式(1)で表わされる四硫酸化N-アセチルラクトサミン四糖、式(11)で表される三硫酸化N-アセチルラクトサミン五糖、式(111)で表される二硫酸化N-アセチルラクトサミン二糖から選ばれることを特徴とする請求項1～4記載の免疫調節剤。

$$\text{Gal}(\text{GS})\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(\text{GS})\beta 1\text{-}3\text{Gal}(\text{GS})\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(\text{GS}) \quad \dots \quad (1)$$

$$\text{NeuAc}\sim\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(\text{GS})\beta 1\text{-}3\text{Gal}(\text{GS})\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(\text{GS}) \quad \dots \quad (11)$$

$$\text{Gal}(\text{GS})\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(\text{GS}) \quad \dots \quad (111)$$

(式中、Galはガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、NeuAcはノイライミン酸を、Acはアセチル基を、GSは6-O-硫酸エステルをそれぞれ表す。また、～は α 2、3結合又は α 2、6結合を表す。)

1.1. ケラタン硫酸オリゴ糖及び／又はその類学的に許容される量を有効成分として含有する免疫調節剤。

1.2. シアル酸及び／又はフコースを含みうる硫酸化されたN-アセチルラクトサミン単位を有するケラタン硫酸オリゴ糖及び／又はその類学的に許容される量を有効成分として含有する免疫調節剤。

1.3. 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、硫酸化されたN-アセチルグルコサミンを還元末端に有する2～5糖単位のオリゴ糖であって、1分子中の少なくとも2個所の水酸基が硫酸化されたケラタン硫酸オリゴ糖である請求項1又は1-2瓶瓶の細胞の分化誘導剤。

シンを還元末端に有する2～5糖単位のオリゴ糖であって、1分子中の少なくとも2個所の水酸基が硫酸化されたケラタン硫酸オリゴ糖である請求項1又は1-2瓶瓶の免疫調節剤。

1.4. 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、少なくとも下記式で表される二糖を構成成分として含むことを特徴とする請求項1～13のいずれか1項記載の免疫調節剤。

(式中、Galはガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、Acはアセチル基を、GSは6-O-硫酸エステルをそれぞれ表す。)

1.5. 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、式(1)で表わされる四硫酸化N-アセチルラクトサミン四糖、式(11)で表される三硫酸化N-アセチルラクトサミン五糖、式(111)で表される二硫酸化N-アセチルラクトサミン二糖から選ばれることを特徴とする請求項1～4記載の免疫調節剤。

$$\text{Gal}(\text{GS})\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(\text{GS})\beta 1\text{-}3\text{Gal}(\text{GS})\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(\text{GS}) \quad \dots \quad (1)$$

$$\text{NeuAc}\sim\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(\text{GS})\beta 1\text{-}3\text{Gal}(\text{GS})\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(\text{GS}) \quad \dots \quad (11)$$

$$\text{Gal}(\text{GS})\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(\text{GS}) \quad \dots \quad (111)$$

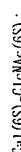
(式中、Galはガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、NeuAcはノイライミン酸を、Acはアセチル基を、GSは6-O-硫酸エステルをそれぞれ表す。また、～は α 2、3結合又は α 2、6結合を表す。)

1.6. ケラタン硫酸オリゴ糖及び／又はその類学的に許容される量を有効成分として含有する細胞の分化誘導剤。

1.7. シアル酸及び／又はフコースを含みうる硫酸化されたN-アセチルラクトサミン単位を有するケラタン硫酸オリゴ糖及び／又はその類学的に許容される量を有効成分として含有する細胞の分化誘導剤。

1.8. 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、硫酸化されたN-アセチルグルコサミンを還元末端に有する2～5糖単位のオリゴ糖であって、1分子中の少なくとも2個所の水酸基が硫酸化されたケラタン硫酸オリゴ糖である請求項1又は1-2瓶瓶の細胞の分化誘導剤。

1.9. 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、少なくとも下記式で表される二糖を構成成分として含むことを特徴とする請求項1～1.8のいずれか1項記載の細胞の分化誘導剤。



(式中、Galはガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、Acはアセチル基を、GSは6-O-硫酸エ斯特ルをそれぞれ表す。)

2.0. 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、式(1)で表される四硫酸N-アセチルタクソミセチルタクソミン四糖、式(II)で表される三硫酸N-アセチルタクソミン五糖、式(III)で表される二硫酸N-アセチルタクソミン二糖から選ばれることを特徴とする請求項2.4記載のアボトーシス誘導剤。



(式中、Galはガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、NeuAcはノイライニン酸を、Acはアセチル基を、GSは6-O-硫酸エ斯特ルをそれぞれ表す。また、～は α 2、3結合又は α 2、6結合を表す。)

2.1. ケラタン硫酸オリゴ糖及び/又はその薬学的に許容される盐を有効成分として含有するアボトーシス誘導剤。

2.2. シアル酸及び/又はフコースを含みうる硫酸化されたN-アセチルタクソミン川位を有するケラタン硫酸オリゴ糖及び/又はその薬学的に許容される盐を有効成分として含有するアボトーシス誘導剤。

2.3. 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、硫酸化されたN-アセチルグルコサミンを還元末端に有する2～5糖川位のオリゴ糖であつて、1分子中の少くとも2個所の水酸基が硫酸化されたケラタン硫酸オリゴ糖を9.9%以上含有し、下記の特性を有するケラタン硫酸オリゴ糖画分。

(a) エンドキシントキシンを実質的に含まず、また核酸、蛋白質、プロテアーゼの含有は検出限界以下である。

(b) ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸及びケラタン硫酸を実質的に含まない。

2.7. 少なくとも下記式で表される二糖を構成成分として含むケラタン硫酸オリゴ糖を9.9%以上含有し、下記の特性を有するケラタン硫酸オリゴ糖画分。

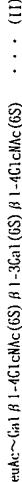
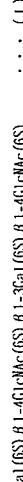


(式中、Galはガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、Acはアセチル基を、GSは6-O-硫酸エ斯特ルをそれぞれ表す。)

(a) エンドキシントキシンを実質的に含まず、また核酸、蛋白質、プロテアーゼの含有は検出限界以下である。

(b) ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸及びケラタン硫酸を実質的に含まない。

2.8. 前記ケラタン硫酸オリゴ糖が、式(1)で表わされる四硫酸化N-アセチルクサミン四糖、式(11)で表される三硫酸化N-アセチルクサミン五糖、式(111)で表される二硫酸化N-アセチルクサミンニ糖から選ばれることを特徴とする請求項2.6又は2.7記載のケラタン硫酸オリゴ糖画分。



(式中、Galはガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、NeuAcはノイミン酸を、Acはアセチル基を、6Sは6-O-硫酸エチルをそれぞれ表す。また、~は α 2, 3結合又は α 2, 6結合を表す。)

2.9. 軟骨魚類由来の高硫酸化ケラタン硫酸をエンド β -N-アセチルグルコサミニダーゼ型ケラタン硫酸分解酵素で分解後、分画して得られる請求項2.6～2.8のいずれか一項に記載のケラタン硫酸オリゴ糖画分。

3.0. ケラタン硫酸を、下記の理化学的性質：

①作用：

ケラタン硫酸に作用し、そのN-アセチルグルコサミニド結合を加水分解する；

②基質特異性：

ケラタン硫酸I、ケラタン硫酸II及びケラタンポリ硫酸に作用し、主な分解物として硫酸化ケラタン硫酸二糖及び硫酸化ケラタン硫酸四糖を生じる；を有するケラタン硫酸分解酵素によって分解するステップと、この分解生成物から下記性質を有するケラタン硫酸オリゴ糖を分画するステップとを含む、ケラタン硫酸オリゴ糖画分の製造法。

(A) 酸化N-アセチルクサミンを基本骨格とするケラタン硫酸オリゴ糖を主成分とする；

(B) エンドキシソームを実質的に含まず、核膜、蛋白質及びプロテアーゼの含有

量は微量もしくは検出限界以下である；

(C) ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸及びケラタン硫酸を実質的に含まない。

3.1. 前記ケラタン硫酸分解酵素によつて分解するステップにおいて、請求

項3.0記載の理化学的性質に加えて、下記の理化学的性質を有するケラタン硫酸分解放酵素を用いることを特徴とする請求項3.0記載のケラタン硫酸オリゴ糖画分の製造法。

①至適反応pH：

4.5～6(0.1M酢酸緩衝液及び10mMトリス-酢酸緩衝液中、37°C)；

②pH安定性：

6～7(0.1M酢酸緩衝液及び10mMトリス-酢酸緩衝液中、37°C、1時間放電)；

③至適反応温度：

5.0～6.0°C(0.1M酢酸緩衝液、pH 6.0、10分反応)；

④熱安定性：

少なくとも4.5°C以下で安定(0.1M酢酸緩衝液、pH 6.0、1時間放置)；

3.2. 前記ケラタン硫酸が高硫酸化ケラタン硫酸であり、ケラタン硫酸オリゴ糖が、式(1)で表される四硫酸化N-アセチルクサミン四糖、式(11)で表される三硫酸化N-アセチルクサミンニ糖、式(111)で表される二硫酸化N-アセチルクサミン二糖のいずれかである請求項3.0又は3.1記載のケラタン硫酸オリゴ糖画分の製造法。

Gal(6S) $\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(6S)\beta 1\text{-}3\text{Gal}(6S)\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(6S) \quad \dots \quad (1)$

NeuAc \sim Gal $\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(6S)\beta 1\text{-}3\text{Gal}(6S)\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(6S) \quad \dots \quad (11)$

Gal(6S) $\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(6S) \quad \dots \quad (111)$

(式中、Galはガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、NeuAcはノイミン酸を、Acはアセチル基を、6Sは6-O-硫酸エチルをそれぞれ表す。また、~は α 2, 3結合又は α 2, 6結合を表す。)

【発明の詳細な説明】

ケラタン硫酸オリゴ糖部分及びそれを含む薬剤

技術分野

本発明は、抗炎症剤、抗アレルギー剤、免疫調節剤、細胞の分化誘導剤、アボトーシス誘導剤及びこれらの薬剤の有効成分として有用なケラタン硫酸オリゴ糖に関する。

背景技術

ケラタン硫酸は、N-アセチルグルコサミン残基の6位がO-硫酸化されたN-アセチルクソサミンを基本構造とするグリコサミノグリカンである。特に、構成二糖単位中のN-アセチルグルコサミン残基の6位以外の水酸基がさらに硫酸化された高硫酸化ケラタン硫酸は、サメなどの軟骨魚類、クジラ、ウシなどの哺乳動物の軟骨、骨や角膜に存在することが知られている。その分解物であるケラタン硫酸オリゴ糖を生成する方法として、ケラタン硫酸に、ペルルス菌細菌由来のケラタン硫酸分解酵素（ケラナーゼII；特開平2-57182号公報）を用いた報告がある。

また、ウシ軟骨由来のケラタン硫酸をケラタナーゼIIで分解後、分画して得られた2-5種のオリゴ糖部分について分析し、下記(1)式で表される二硫酸化N-アセチルクソサミン四糖（以下、「ケラタン硫酸四糖(1)」ともいう）

$$\text{Gal}(\text{6S})\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(\text{6S})\beta 1\text{-}3\text{Gal}(\text{6S})\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(\text{6S}) \quad \dots \quad (1)$$

$$\text{Gal}(\text{6S})\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}(\text{6S}) \quad \dots \quad (1)$$

$$\dots \quad (III)$$

(式中、Galはガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、Neu5はノイミン酸を、Acはアセチル基を、6Sは6-O-硫酸エヌステルをそれぞれ表す。また、～はα, 2, 3結合又はα, 2, 6結合を表す。)

しかしながら、現在までに不純物（例えばエンドトキシン、核酸、蛋白質、プロテアーゼ、ケラタン硫酸オリゴ糖以外の他のグリコサミノグリカン類等）を除去した純粋なケラタン硫酸オリゴ糖、特にケラタン硫酸四糖(1)、ケラタン硫酸五糖(1I)及びケラタン硫酸二糖(III)を効率良く大量に調製した報告はない。

特に、このような不純物の混在は、ケラタン硫酸オリゴ糖を医薬品として利用する場合に致命的な欠点になるおそれがある。更に、このケラタン硫酸オリゴ糖の薬理作用（特に、抗炎症作用、抗アレルギー作用、免疫調節作用、細胞の分化誘導作用、アボトーシス誘導作用）については全く知らない。

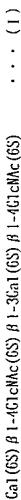
発明の開示

本発明は、上記観点からなされたものであり、不純物が実質的に混在しないケラタン硫酸オリゴ糖を抗炎症剤、抗アレルギー剤、免疫調節剤、細胞の分化誘導剤（以下、「分化誘導剤」という）又はアボトーシス誘導剤として利用することを課題とする。

本発明者は、上記課題を解決するために、高硫酸化ケラタン硫酸をケラタン硫酸分解酵素で分解し、その分解産物の中から二～五糖単位のオリゴ糖、特に二糖、四糖及び五糖単位のオリゴ糖を調査し、その薬理作用について検討研究を重ねた結果、これらのオリゴ糖及びその塩が優れた抗炎症作用、抗アレルギー作用、免疫調節作用、細胞の分化誘導作用、アボトーシス誘導作用を示すことを見い出した。本発明を完成するに至った。

即ち、本発明の抗炎症剤、抗アレルギー剤、免疫調節剤、分化誘導剤又はアボトーシス誘導剤（以下、これら薬剤を総称して「本発明の薬剤」ということがある）は、ケラタン硫酸オリゴ糖及び／又はその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する。本明細書において「ケラタン硫酸オリゴ糖」とは、ケラタン硫酸をエンド-β-N-アセチルグルコサミニアセチルケラタン硫酸分解酵素で分解して得られるケラタン硫酸の分解生成物を意味する。

(11) 互鎖単位のオリゴ糖であつて、1分子中の少なくとも2個所の水酸基が硫酸化されたケラタン硫酸オリゴ糖、特に、少なくともGal(6S)-GlcNAc(6S)（ただし、Gal(6S)はガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、Acはアセチル基を、6Sは6-O-硫酸硫酸オリゴ糖と表す。）で表される二糖構成成分として含む上記ケラタンエステルをそれぞれ表す。）で表される二糖構成成分として含む上記ケラタン硫酸オリゴ糖が例示される。さらに、前記ケラタン硫酸オリゴ糖として、下記（1）式で表される四硫酸化N-アセチルクタサミン四糖、（11）式で表される三硫酸化N-アセチルクタサミン五糖、（111）式で表される二硫酸化N-アセチルクタサミン二糖等が好適な例として挙げられる。



（式中、Galはガラクトースを、GlcNAcはグルコサミンを、NeuAcはノイラミン酸を、Acはアセチル基を、6Sは6-O-硫酸エーステルをそれぞれ表す。また、～は α 2, 3結合又は α 2, 6結合を表す。）

本発明はまた、硫酸化されたN-アセチルクタサミンを還元末端に有する二～五糖単位のオリゴ糖であつて、1分子中の少なくとも2個所の水酸基が硫酸化されたケラタン硫酸オリゴ糖を9.9%以上含有し、下記の特性を有するケラタン硫酸オリゴ糖画分を提供する。

(a) エンドトキシンを実質的に含まず、また様酸、蛋白質、プロテアーゼの含有量は検出限界以下である。

(b) ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸及びケラタン硫酸を実質的に含まない。

本発明はまた、少なくともGal(6S)-GlcNAc(6S)で表される二糖を構成成分とした

て含むケラタン硫酸オリゴ糖を9.9%以上含有し、かつ上記(a)および(b)の特性を有するケラタン硫酸オリゴ糖画分を提供する。また、前記オリゴ糖画分に含有されるケラタン硫酸オリゴ糖として、上記(1)式で表される四硫酸化N-アセチルクタサミン四糖、（11）式で表される三硫酸化N-アセチルクタサミン五糖、（111）式で表される二硫酸化N-アセチルクタサミン二糖等が

好適な例として挙げられる。さらに、これらのケラタン硫酸をエンド-β-N-アセチルグルコサミン型ケラタン硫酸分解酵素で分解、分画して得られるケラタン硫酸オリゴ糖が挙げられる。

本発明はさらに、ケラタン硫酸を、下記の理化学的性質：

①作用：

ケラタン硫酸に作用し、そのN-アセチルグルコサミニド結合を加水分解する：

②基質特異性：

ケラタン硫酸 I、ケラタン硫酸 II及びケラタンボリ硫酸に作用し、主な分解物として硫酸化ケラタン硫酸二糖及び硫酸化ケラタン硫酸四糖を生じる；、好ましくはさらに下記の理化学的性質：

③至適反応pH：

4.5～6(0.1M 酢酸緩衝液及び10mM トリス一酢酸緩衝液中、37°C)；

④pH安定性：

6～7(0.1M 酢酸緩衝液及び10mM トリス一酢酸緩衝液中、37°C、1時間放置)；

⑤至適反応温度：

5.0～6.0°C(0.1M 酢酸緩衝液 pH 6.0、10分反応)；

⑥熱安定性：

少なくとも45°C以下で安定(0.1M 酢酸緩衝液、pH 6.0、1時間放置)、を有するケラタン硫酸分解酵素によって分解するステップと、この分解生成物から下記性質を有するケラタン硫酸オリゴ糖を分画するステップとを含む、ケラタン硫酸オリゴ糖画分の製造法を提供する。

(A) 硫酸化N-アセチルクタサミンを基本骨格とするケラタン硫酸オリゴ糖を主成分とする；

(B) エンドキシンを実質的に含まず、核酸、蛋白質及びプロテアーゼの含有量は微量もしくは検出限界以下である；

(C) ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマクタン硫酸、ヘパラン硫酸及びケラタン硫酸を尖端的に含まない。

また、上記ケラタン硫酸四分の製造方法において、上記(1)式で表される四硫酸N-アセチルトサミン四肽、(11)式で表される三硫酸N-アセチルトサミン二肽等を含むケラタン硫酸オリゴ糖は、通常2～4カ所が硫酸化されているものである。また、本発明において用いることは、通常2～4カ所が硫酸化されているものである。また、本発明において用いることは、シアル酸を含むケラタン硫酸オリゴ糖は、通常2～4カ所が硫酸化されているものである。また、本発明において用いることは、シアル酸としては、N-アセチルノラミニド及びN-アセチルノリコリノラミニドを挙げることができるが、好ましいのは α -D-ガラクトース-6-硫酸である。また、シアル酸が α 、3結合又は α 、2、6結合したものの何れをも用いることができるが、好ましいのは α 、2、3結合したものである。

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明に用いるケラタン硫酸オリゴ糖およびケラタン硫酸は、主として本発明に用いるケラタン硫酸の原料となるケラタン硫酸は、主としてガラクトース又はガラクトース-6-硫酸とN-アセチルグルコサミン-6-硫酸との二部の熱り返し構造で構成され、動物繊維及び蛋白などによって硫酸含有量が異なっているが、通常はサメなどの軟骨魚類、クリ、ウシなどの哺乳動物の軟骨、骨や角膜等の生原材から製造される。

原料として使用されるケラタン硫酸は、通常入手できるものであればよく、特に限定されないが、構成鎖であるガラクトース残基が硫酸化された高硫酸化ケラタン硫酸(構成二糖当たり1.5～2分子の硫酸基を含む高硫酸化ケラタン硫酸セターカラントボリ硫酸ということもある)を用いることが好ましい。また、ガラクトース残基の硫酸基の位置としては、6位が好ましい。このような高硫酸化ケラ

タン硫酸は、例えば、サメ等の軟骨魚類の軟骨のプロテオグリカンから取得できることもある。また、市販しているものを使用することもできる。

本発明のケラタン硫酸オリゴ糖は、ケラタン硫酸、好ましくは高硫酸化ケラタン硫酸の緩衝溶液にエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ型ケラタン硫酸分解酵素、例えばパチルス属細菌由来のケラトナーゼII(特開平2-57182号公報)、または本発明者がパチルス属に属する細菌から新たに見出した新規ケラタン硫酸分解酵素を作用させて分解した後、得られた分解物を分離することにより得られる。この分解反応は、例えばケラタン硫酸濃度1.0～100mg/m³で、pH 6.0～7.0に調整された緩衝溶液を温度25～40℃で1～72時間反応させて行われる。この場合、緩衝液の濃度は、通常0.01～0.2Mである。緩衝液としては、上記pH範囲に調整できるものであれば、種類は特に制限されず、例えば酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス緩衝液が挙げられる。

また、分解反応に使用される酵素の量は、ケラタン硫酸1gに対して0.1から1.0ユニットが例示できる。ここで、1ユニットとは、1分間に1μmolのN-アセチルグルコサミンに相当する還元末端を生成する酵素量である。

上記の新規ケラタン硫酸分解酵素は、パチルス・サーチュラヌス、例えば本発明者らによって分離されたパチルス・サーチュラヌスKST202株が产生する酵素であり、稳定性に優れたケラタン硫酸分解酵素である。この酵素は、パチルス・サーチュラヌスKST202株を好適な条件下培養し、この培地又は及び細菌菌体から、通常の酵素の精製法に則して精製することにより得られる。パチルス・サーチュラヌスKST202株は、平成6年9月5日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305 日本国茨城県つくば市真一丁目1番3号)に微生物受託番号FERM P-14516として寄託され、平成7年11月6日にフダベスト条約に基づく国際登録に登録されて、FERM B

P

—5285の受託番号で登記されている。

また、上記新規ケラタン硫酸分解酵素の理化学的性質を以下に示す。

①作用：

ケラタン硫酸に作用し、そのN-アセチルグルコサミニド結合を加水分解する。

② 基質特異性：

ケラタン硫酸、ケラタン硫酸自及びケラタン硫酸に作用し、主な分解物として硫酸化ケラタン硫酸二糖及び硫酸化ケラタン硫酸四糖を生じる。また、硫酸化ケラタン硫酸も生じることが確認されている。

③ 至適反応 pH：

4.5～6 (0.1M 酚酸緩衝液及び10ml トリス一酢酸緩衝液中、37°C)。

④ pH 安定性：

少なくとも4.5°C以下で安定 (0.1M 酚酸緩衝液、pH 6.0、1時間反応) 本発明のケラタン硫酸オリゴ糖所分を製造する際には、この成な新規ケラタン硫酸分解酵素上記ケラタナーゼⅠなどのケラタン硫酸分解酵素を、更に、常法により固定化した固定化酵素を用いて反応を行わせることもできる。

上記のような酵素による分解反応によって、ケラタン硫酸はオリゴ糖に分解される。

⑤ 至適反応温度：

5.0～6.0°C (0.1M 酚酸緩衝液、pH 6.0、10分反応)

⑥ 烈安定性：

少なくとも4.5°C以下で安定 (0.1M 酚酸緩衝液、pH 6.0、1時間反応) 本発明のケラタン硫酸オリゴ糖所分を製造する際には、この成な新規ケラタン硫酸分解酵素上記ケラタナーゼⅠなどのケラタン硫酸分解酵素を、更に、常法により固定化した固定化酵素を用いて反応を行わせることもできる。

次に、こうして得られたオリゴ糖は、通常の分離精製方法、例えば、エタノール沈澱や各種クロマトグラフィーによって精製され、目的のケラタン硫酸オリゴ糖を分離精製することができます。この判別方法を例えば二糖、四糖及び五糖のケラタン硫酸オリゴ糖の場合について更に詳しく説明すると、通常、前記分解生成物を初めエタノール沈澱によって濾過し、次いでゲル通過 (分画分子量範囲100～10,000) により、ほぼ二糖、四糖、五糖近辺のケラタン硫酸オリゴ糖にそれぞれ分離する。更に、この粗画分を陰イオン交換クロマトグラフィーによつて、エンドトキシンを実質的に含まず、また、核酸、蛋白質、プロテアーゼ

の含有量は検出限界以下であり、さらにビアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸及びケラタン硫酸を実質的に含まない、すなわち実質的に純度が二糖、四糖および五糖に分離、分離する。本発明において「実質的に含まない」とは、幾段な検出法によって検出はされるが、ケラタン硫酸オリゴ糖の薬理作用 (抗炎症作用、抗アレルギー作用、免疫調節作用、細胞の分化誘導作用、アボトーシス誘導作用等) に影響を及ぼさない程度の含有であることをいいう。

また、本発明のケラタン硫酸オリゴ糖は、ケラタン硫酸を原料とし、これをエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼによって分解し、二～五糖単位のオリゴ糖画分を分離したものであり、原料であるケラタン硫酸を実質的に含まない。

尚、ケラタン硫酸を構成するガラクトース又はガラクトース-6-硫酸とN-アセチルグルコサミン-6-硫酸とのN-アセチルグルコサミド結合を後発的に又は特異的に切断する化学的分解法によってケラタン硫酸を分解した分解物からも、ケラタン硫酸オリゴ糖は販売され得る。

上記のようにして、ケラタン硫酸オリゴ糖、特に前記(1)式で表される四硫酸化N-アセチルガラクトサミン四糖、(II)式で表される三硫酸化N-アセチルガラクトサミン五糖、(III)式で表される二硫酸化N-アセチルガラクトサミン二糖等が得られる。なお、式(1)、式(II)、式(III)で表される物質の核磁気共鳴スペクトル (¹H-NMR, ¹³C-NMR) 及び高速原子衝撃質量分析による解析結果は、後述の実施例に示す通りである。

また、本発明に用いられるケラタン硫酸オリゴ糖は、危険した状態のもの、プロトンが付加した構造のもの、或はアルカリ金属 (ナトリウム、カリウム、リチウム等) やアルカリ土類金属 (カルシウム等) 、アンモニア (アソニウム等) の無機塩基との間で形成された塩、又はジエタノールアミン塩、シクロヘキシルアミン塩、アミニノ酸塩等との有機塩基との間で形成された塩のうち、理学的に許容される塩も包含する。

また、本発明に用いられるケラタン硫酸オリゴ糖及び/又はその塩と、通常医薬に用いられる担体、賦形剤、その他の添加物等とからなる医薬組成物も新規な

ものであり、抗炎剤、抗アレルギー、免疫調節、細胞の分化誘導、アボトーシス説等を目的として投与することができる。

本発明のケラタン硫酸オリゴ糖類分は、以上的方法により、ケラタン硫酸、特に高硫酸化ケラタン硫酸の酵素分解物から、エンドキシン、核酸、蛋白質、ブロテアーゼ、目的のケラタン硫酸オリゴ糖以外の他のクリコサミノグリカン類等の不純物を除去し、ケラタン硫酸オリゴ糖の含有量を99%以上としたものである。

(2) 本発明の薬剤

上記のようなケラタン硫酸オリゴ糖及び／又はその聚物的に許容される塩は、抗炎症剤、抗アレルギー剤、免疫調節剤、分化誘導剤あるいはアボトーシス誘導剤等、その他の用済の医薬品として広く利用できる。

本発明の抗炎症剤は、炎症が関与するあらゆる疾患に対して有効であるが、具体的な適応症として、例えば慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、変形性脊椎症、変形性關節症、腰筋症、手筋後及び外傷後の炎症及び腫脹の緩解、肩甲骨筋肉炎、腸間筋炎、上腕骨筋炎（テニス肘）、筋肉痛、角結膜炎等を示すことができる。本発明の抗炎症剤は、含有するケラタン硫酸オリゴ糖及び／又はその聚物的に許容される塩の働きでこれらの疾患並びに症状に対する鎮痛、消炎、解熱作用を有する。

本発明の抗アレルギー剤はアレルギーが関与するあらゆる疾患に対して有効であるが、具体的な適応症として、例えばアレルギー性鼻炎、アレルギー性角膜炎、春季カタル、過敏皮膚炎、尋常疹、アトピー性皮膚炎等を示すことができる。

本発明の免疫調節剤は、免疫系の異常ににより引き起こされるあらゆる疾患に対して有効であるが、具体的な適応症として、例えばヒト自己免疫性リンパ管増殖症候群、リンパ球増殖症候群、リウマチ、全身性エリテマトーデス、血管免疫細胞性リンパ管増殖症候群、リウマチ、全身性疾患、慢性大腸炎、進行性全身性硬皮病、多癡性筋炎（皮膚筋炎）、シェーグレン症候群、免疫細胞性リンパ管症候群、慢性関節リウマチ、全身性硬化症、多癡性筋炎（皮膚筋炎）、シェーグレン症候群、姦娠、白血病、リンパ腫、癌转移の抑制、過形成の防止（乾細胞の治療）、創傷治癒、骨髄異形成症候群、強皮症等を示すことができる。

本発明のアボトーシス誘導剤は、生理的なアボトーシスの不全、免疫系の異常により引き起こされるあらゆる疾患に対して有効であるが、具体的な適応症としては、例えばヒト自己免疫性リンパ管増殖症候群、リウマチ、全身性疾患、慢性大腸炎、進行性全身性硬皮病、多癡性筋炎（皮膚筋炎）、シェーグレン症候群、免疫細胞性リンパ管症候群、慢性関節リウマチ、全身性硬化症、多癡性筋炎（皮膚筋炎）、シェーグレン症候群、姦娠、白血病、リンパ腫、癌转移の抑制、過形成の防止（乾細胞の治療）等を示すことができる。

リップマックスにおいてそれらの効果が認められた。ヒト自己免疫性リンパ管増殖症候群における抑制、分化誘導、およびアボトーシス誘導については、MRI-ip

2862-2869(1995))、免疫芽細胞性リンパ病症 (immunoblastic lymphadenopathy ; The American Journal of Medicine 63, 849-(1977))、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、円板状エリテマトーデス、多癡性筋炎（皮膚筋炎）、強皮症、混合結合組織病、慢性甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中垂症、悪性貧血、グッドーバースチュア (Good-pasture) 症候群、急性進行性系膜骨炎、重症筋膜無力症、尋常性天疱瘡、水泡性天疱瘡、インスリン低抗性糖尿病、若年性糖尿病、アシンдром、萎縮性胃炎、男性不妊症、早癡性更年期、水晶体障害などと煦炎、交感性眼炎、多癡性眼炎、慢性活動性肝炎、炎症性眼疾患（クローネ病、潰瘍性大腸炎等）、原発性胆汁性肝硬変、慢性活動性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、発作性血色紫斑症、特癡性小板減少症紫斑症、シェーグレン症候群、粒線瘤抗体症候群等を挙げることができる。

本発明の分化誘導剤は、生理的な細胞分化の不全、免疫系の異常、悪性腫瘍等により引き起こされるあらゆる疾患に対して有効であるが、具体的な適応症としては、例えば、ヒト自己免疫性リンパ管増殖症候群、リウマチ、慢性関節リウマチ、全身性硬化症、多癡性筋炎、免疫芽細胞性リンパ管症候群、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎等）、進行性全身性硬化症、多癡性筋炎（皮膚筋炎）、シェーグレン症候群、姦娠、白血病、リンパ腫、癌转移の抑制、過形成の防止（乾細胞の治療）、創傷治癒、骨髄異形成症候群、強皮症等を示すことができる。

本発明のアボトーシス誘導剤は、生理的なアボトーシスの不全、免疫系の異常により引き起こされるあらゆる疾患に対して有効であるが、具体的な適応症としては、例えばヒト自己免疫性リンパ管増殖症候群、リウマチ、全身性疾患、慢性大腸炎、進行性全身性硬皮病、多癡性筋炎（皮膚筋炎）、シェーグレン症候群、免疫細胞性リンパ管症候群、慢性関節リウマチ、全身性硬化症、多癡性筋炎（皮膚筋炎）、シェーグレン症候群、姦娠、白血病、リンパ腫、癌转移の抑制、過形成の防止（乾細胞の治療）等を示すことができる。

リップマックスにおいてそれらの効果が認められた。ヒト自己免疫性リンパ管増殖症候群

性

表1

投与経路	剤型
静脈内、筋肉内、皮下、皮内 関節腔内、眼内	注射剤
点眼	点眼剤
点入	軟膏剤
経口	錠剤、カプセル剤、顆粒剤 液剤、液剤、リポ化剤
経皮	軟膏剤、ゲル剤、外用散剤、スプレー剤
吸入	スプレー剤、吸入散剤

表2

投与経路	剤型
静脈内、筋肉内、皮下、皮内	注射剤
経口	錠剤、カプセル剤、顆粒剤 散剤、液剤、リポ化剤

症候群 (autoimmune lymphoproliferative syndrome) は、MRL-lpr/lprマウスと同様に F₁子遺伝子の異常が原因とされており、またリンパ節の腫脹が見られるなど、MRL-lpr/lprマウスの特徴との相似性が高い。MRL-lpr/lprマウスは、ヒト自己免疫性リンパ細胞活性亢進症候群のモデルといえる。よって、免疫調節剤、分化能導梢およびアボトーシス誘導剤において、最も好ましい本発明薬剤の適応症は、ヒト自己免疫性リンパ球増殖性症候群 (autoimmune lymphoproliferative syndrome) である。

本発明の薬剤は、注射 (筋肉内、皮下、皮内、筋膜内、関節腔内、眼内、腹腔内等)、点眼、点入、経皮、吸入等の投与方法に応じて、製剤化することができる。種型としては、注射剤 (溶液、懸濁液、乳濁液、用時溶解用固形剤等)、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤、リポ化剤、外用散剤、スプレー剤、吸入散剤、点眼剤、眼軟膏剤等が挙げられる。製剤調製に当たり、慣用の賦形剤、結合剤、滑剤剤、その他着色剤、防腐剤等、通常医薬品に用いられる成分を使用することができる。また、本発明の薬剤においては、ケラタン硫酸オリゴ糖と共にこれ以外の抗炎症成分、抗アレルギー成分、免疫調節成分、分化能導梢成分、アボトーシス誘導成分等を併用することもできる。

上記の投与方法および種型のうち、抗炎症および抗アレルギー剤において好みのものを表1に示す。また、免疫調節、分化能導梢およびアボトーシス誘導剤において好みの投与方法及び剤型を表2に示す。

本発明の抗炎症剤、抗アレルギー剤の推定有効投与量は、全身的に投与される場合、ケラタン硫酸オリゴ糖の量として 300～300 mg /人 /日であり、また局所的に投与される場合、1～10 mg /人 /日である。また、本発明の免疫調節剤、分化能導梢、アボトーシス誘導剤の推定有効投与量は、ケラタン硫酸オリゴ糖の量として 30～6000 mg /人 /日である。

図面の簡略な説明

図1は、実施例1で製造した四硫酸化N-アセチルクトサミン四糖 (ケラタン硫酸四糖(1))についてHPLCによるゲル通過を行った時のクロマトグラムを

示す図である。

図2は、実施例1で製造した三塩酸化N-アセチルラクトサミン五糖(ケラターン硫酸五糖(1))についてHPLCによるゲル通過を行った時のクロマトグラムを示す図である。

図3は、実施例1で製造した二塩酸化N-アセチルラクトサミン二糖(ケラターン硫酸二糖(1))についてHPLCによるゲル通過を行った時のクロマトグラムを示す図である。

図4は、実施例1で製造したケラターン硫酸五糖(1)の400MHzにおける¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図5は、ケラターン硫酸四糖(1)、ケラターン硫酸五糖(1)又はケラターン硫酸二糖(1)を投与したハイドロアルカヤの脚部液波を示す図である

図6は、炎症を惹起させたラットに対し、炎症惹起5分前にケラターン硫酸四糖(1)又は各種試験物質を投与したときの足背部の経時変化を示す図である。

図7は、炎症を惹起させたラットに対し、炎症惹起3時間前にケラターン硫酸(1)又は各種試験物質を投与したときの足背部の経時変化を示す図である

図8は、ケラターン硫酸四糖(1)又は酢酸デキサメサンを投与したカラゲニン硫酸モルラットの胸水液波を示す図である。

図9は、ケラターン硫酸四糖(1)又は酢酸デキサメサンを投与したカラゲニン硫酸モルラットの胸水中の白血球数を示す図である。

図10は、N-カルニル-Mac-Laur-Phe(FMLP)刺激によるモルモット好中球に対する、ケラターン硫酸四糖(1)、ケラターン硫酸五糖(1)及びケラターン硫酸二糖(1)の活性度を示す図である。

図11は、ケラターン硫酸四糖(1)投与及び非投与のアレルギー性結膜炎モルモットの結膜炎の程度の評点を示す図である。

図12は、ケラターン硫酸五糖(1)、ケラターン硫酸五糖(1)又はケラターン硫酸二糖(1)投与及び非投与のアレルギー性結膜炎モルモットの結膜炎

の程度の評点を示す図である。

図13は、アレルギー結膜炎モデルモルモットに対し、各種濃度でケラターン硫酸四糖(1)を投与したときの結膜炎の程度の評点を示す図である。

図14は、自己免疫疾患モデルマウスであるMRLマウスに対し、各種投与量でケラターン硫酸二糖(1)を28日間反復投与したときのマウスの頸下リンパ節重量を示す図である。

図15は、各種投与量でケラターン硫酸二糖(1)を56日間反復投与したときのMRLマウスの腹臍膜リンパ節重量を示す図である。

図16は、各種投与量でケラターン硫酸二糖(1)を56日間反復投与したときのMRLマウスの頸下リンパ節重量を示す図である。

図17は、各種投与量でケラターン硫酸二糖(1)を投与したときのMRLマウスの腹臍膜リンパ節切片標本(HE染色)の染色濃度についての解析結果を示す図である。

図18は、各種投与量でケラターン硫酸二糖(1)を投与したときのMRLマウスの頸下リンパ節切片標本(HE染色)の染色濃度についての解析結果を示す図である。

図19は、各種投与量でケラターン硫酸二糖(1)を投与したときのMRLマウスのリンパ球におけるCD3及びCD4陽性細胞の割合(%)を示す図である。

図20は、各種投与量でケラターン硫酸二糖(1)を投与したときのMRLマウスのリンパ球におけるCD3及びCD8a陽性細胞の割合(%)を示す図である。

図21は、各種投与量でケラターン硫酸二糖(1)を投与したときのMRLマウスのリンパ球におけるCD3及びB220陽性細胞の割合(%)を示す図である。

図22は、各種投与量でケラターン硫酸二糖(1)を投与したときのMRLマウスの頸下リンパ節中のアボートーシス細胞数を示す図である。

以下、本発明を実施例によって更に具体的に説明する。なお、製造例は、ハチミツを実施するための供試の形態

ルス菌細胞から得られた新規なケラタン凝溶分解酵素の製造例を示し、実施例1

1.0.

は、ケラタン硫酸オリゴ糖側分の製造実施例、実施例2はケラタン硫酸側を示す。また、実施例3、4、5の急性毒性及び各種型作用の実施例をそれぞれ示す。また、実施例3、4、5及び6は製造の実施例である。

製造例 ケラタン凝溶分解酵素の製造

(1) バチルス・サーキュラヌ K_s T 202株の分離

管紫酸、無機塩及びケラタン硫酸を含む液体培地5mlに土壌を少量添加し、4.5℃で3日間、振盪培養した。培養後、培養上清10μlを過紙にスポットした。同様に培地(対照)も10μl過紙にスポットした。風乾後、トルイシンブルー液に過紙を浸した。薄い硝酸銀で充分過紙を洗浄した後、スポット部位の色調を培養上清と対照について比較した。トルイシンブルーは、ケラタン硫酸と結合して青色を示すので、対照に比べて色調が薄くなつた試料にはケラタン硫酸化性菌の存在が確認され、培養液から菌を平板培地(例えば、ハートイシフュージョン寒天培地: Heart infusion Agar)を用いて、常法により純粋分離した。

純粋分離した種々の菌について、液体培地を用いて上記と同様にしてケラタン硫酸の消化能を調べることにより、ケラタン硫酸化性菌を得た。この株の形態学的性質、生育特性、生物学的性質を調べた結果、水槽株は、バチルス・サーキュラヌ(Bacillus circulans)と同定された。水槽株は、ケラタン硫酸を消化する点で公知の菌株と区別される新菌株である。尚、バチルス・サーキュラヌ K_s T 202株は、平成6年9月5日に工業技術院生命工芸技術研究所に受託番号FERM P-14516として登託され、平成7年11月6日にブダペスト条約に基づく国際登記に移管されて、FERM BP-5285の登記番号で登託されている。

(2) ケラタン硫酸分解酵素の調製

ペプトン(極東製薬工業(株)製)1.5%、ビーカル酵母エキス(日本製薬(株)製)0.75%、サメ軟骨より調製したケラタンボリ硫酸(生化学工業(株)製)0.75%、K₂HPO₄ 0.5%、MgSO₄ 7H₂O 0.02%、NaC

5%、消泡剤アテカノールLG109(商品名、旭電化工業(株)製)0.001

1.5%(pH8.0)の組成からなる培地20lを30l容皿のシャーファームスターに仕込み、12.1℃で20分間蒸気滅菌後、半同じ培地で37℃で16時間振盪培養しておいたK_s T 202株の培养液1L(5%)を無菌的に植菌し

、4.5℃で24時間通気(1vvm)懸抨(3000rpm)培養した。培养液2

0.1Lを連続遠心分離機で処理して菌体を除き、約20Lの菌体外液を得た。

この菌体外液に硫酸アンモニウムを0.7mol/Lになるように加え、生じた沈殿を遠心分離で集め、2.5Lの1.0mMトリス酢酸緩衝液(pH7.5)に溶解した。この溶液に硫酸アンモニウムを0.35mol/Lになるように添加し、生じた沈殿を遠心分離で除き、更に硫酸アンモニウムを0.5mol/Lになるように添加後、生じた沈殿を遠心分離で回収した。

沈殿を2.5Lの1.0mMトリス酢酸緩衝液(pH7.5)に溶解し、予め同緩衝液で平衡化したDEAE-セルロースDE52(ファルマントクカラム(5.2×2.4cm))に通して解離を吸着させた。同緩衝液1.5Lでカラムを洗滌後、同緩衝液中、食塩濃度を直線的に0から0.3Mに上昇させ、解離を放出させた。

活性画分を集めて硫酸アンモニウムを0.5mol/Lになるように添加し、沈殿を遠心分離で集め、少量の1.0mMトリス酢酸緩衝液(pH7.5)に溶解した。その後、セファクリルS-300(ファルマントクカラム(3.4×1.0cm))に負荷し、0.5Mの食塩を含む5.0mMトリス酢酸緩衝液(pH7.5)でゲル通過を行った。

活性画分をUK-10膜(アドバンテック東洋(株)製)を用いた限外過濾で透析し、約1.0倍量の1.0mMトリス酢酸緩衝液(pH7.5)で透析した。内液を予め同緩衝液で平衡化したDEAE-トヨハール(東ソー(株)カラム(2.2×1.5cm))に通して解離を吸着させ、0.1Mの食塩を含む同緩衝液1.50mlでカラムを洗浄後、同緩衝液中、食塩濃度を直線的に0.1から0.2Mに上昇させ、解離を放出させた。

活性部分を限外濾過で濾過し、セファクリルS-300カラム (2.2×10 cm) に負荷し、ゲル通過を行った。

活性部分に食塩を4Mになるように添加した後、4M食塩を含む10 mMトリス酢酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したフェニルセファロース (フェルマンシアヒドリカラム (1.6×15 cm)) に通して酵素を吸引させ、同緩衝液中、食塩濃度を直線的に4Mから0に減少させ酵素を溶出させた。

得られた酵素は2.9ユニットであり、比活性は2.09ユニット/mg (ウシ血清アルブミン底物質) であった。精製酵素中にグリコシダーゼ類の夾雜酵素は含まれていなかつた。

このようにして得られたケラタン硫酸分解酵素は、以下に示す性質を有している。

①作用：

ケラタン硫酸に作用し、そのN-アセチルグルコサミニド結合を加水分解する。

②基質特異性：

ケラタン硫酸I、ケラタン硫酸II及びケラタン硫酸に作用し、主な分解物として脱酰化ケラタン硫酸二糖及び脱酰化ケラタン硫酸四糖を生じる。また、硫酸化ケラタン硫酸五糖も生じることが確認されている。

③至適反応pH：

4.5～6 (0.1M酢酸緩衝液及び10mMトリス-酢酸緩衝液中、37℃)

④pH安定性：

6～7 (0.1M酢酸緩衝液及び10mMトリス-酢酸緩衝液中、37℃、1時間放置)

⑤耐熱反応温度：

50～60℃ (0.1M酢酸緩衝液、pH 6.0、10分反応)

⑥熱安定性：

少なくとも45℃以下で安定 (0.1M酢酸緩衝液、pH 6.0、1時間放置)
以下の実施例では、上記のようにして得られたケラタン硫酸分解酵素を用いた

が、本発明はこの酵素に限定されるものではなく、例えばケラチナーゼIのよう他のエンド-β-N-アセチルグルコサミニターゼ型ケラタン硫酸分解酵素を用いてもよい。

実施例1

サメ軟骨由来の高硫酸化ケラタン硫酸50gを300mlの0.1M酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解した。この液に上記ケラタン硫酸分解酵素を2.5ユニット加えて37℃で2.4時間分解を行った。反応終了後、2倍量 (容皿、以下同様) のエタノールを加えて攪拌し、室温で一晩放置した。翌日、反応液を遠心分離 (4000 rpm、15分) により上清と沈殿とに分離し、上清を減圧濃縮した

(以下、この濃縮物を上清Aという)。一方、沈殿には300mlの蒸留水を加えて溶解し、3倍量のエタノールを加えて攪拌後、室温にて一晩放置した。翌日、遠心分離にて上清と沈殿を分け、上清を減圧濃縮した (以下、この濃縮物を上清Bという)。

上清Aを少量の蒸留水に溶解し、バイオガルP-2カラム (バイオラッド社製) (3.6×13.4 cm) を用い、蒸留水を浴槽としてゲル濃過クロマトグラフ (イオン交換クロマトグラフィー) を行ない、さらにイオン交換クロマトグラフを行なって、ケラタン硫酸四糖 (I)、ケラタン硫酸五糖 (II) 及びケラタン硫酸二糖 (III) を含む画分をそれぞれ分取して純結乾燥した。

これらのケラタン硫酸オリゴ糖画分をそれぞれ少量の蒸留水に溶解し、予め蒸留水で平衡化したムロマクカラム (宝町化学工業 (株) 製) (4.3×3.5 cm) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによりそれぞれさらに精製した。溶出浴槽には食塩水を用い、食塩濃度を直線的に0から3Mに上昇させて、ケラタン硫酸四糖 (I)、ケラタン硫酸五糖 (II)、ケラタン硫酸二糖 (III) をそれぞれ分取して純結乾燥した。

得られたケラタン硫酸四糖 (I) 画分、ケラタン硫酸五糖 (II) 画分、ケラタン硫酸二糖 (III) 画分をそれぞれ減圧濃縮後、セルロファインGCL-25カラム (生化学工業 (株) 製) (3.2×12.5 cm) を用いたゲル濃過クロマトグラフィーにより脱脂し、浄結乾燥した。

少なくとも45℃以下で安定 (0.1M酢酸緩衝液、pH 6.0、1時間放置)
以下の実施例では、上記のようにして得られたケラタン硫酸分解酵素を用いた

¹³C-NMR δ (D₂O, 25°C) : 177.80, 177.32, 176.86, 105.92, 105.78, 104.94,
102.60, 97.86, 93.32, 85.08, 82.55, 82.04,
79.75, 78.16, 77.93, 75.69, 75.59, 75.48, 75.24
こうして得られたケラタン硫酸四酯 (1)、ケラタン硫酸五酯 (1I) 及びケラ
タン硫酸二酯 (1II) についてHPLC (高速液体クロマトグラフィー) によるゲル
通過を行った時のクロマグラムをそれぞれ図1、図2、図3に示す。

ケラタン硫酸 5.0 g から得られたケラタン硫酸四酯 (1) は 7.8 g (15.6
%)、ケラタン硫酸五酯 (1I) は 1.3 g (2.6%)、ケラタン硫酸二酯 (1II)
I) は 1.0. 4 g (20.8%) であり、いずれにもエンドキシン、核酸、蛋
白質、プロテアーゼ、他のグリコサミノグリカン類は含まれていなかつた。
得られたケラタン硫酸四酯 (1)、ケラタン硫酸五酯 (1I) 及びケラタン硫酸
二酯 (1II) の¹H-NMRスペクトルを日本電子JNM-E X 400 (400MHz)、¹³C
-NMRスペクトルを日本電子JNM-E X 400 (100MHz) を用い、3-(トリメ
チルシリル) プロピオン酸ナトリウム-D₄を内部標準物質として測定した。ケ
ミカルシフトは δ (ppm)、結合定数は H-H で表した。測定結果を以下に示す。
ケラタン硫酸四酯 (1)

¹H-NMR δ (D₂O, 40°C) : 4.757 (H, d), 4.565 (H, d), 4.561 (H, d), 4.402 (H, dd),
4.312 (2H, dd), 3.711 (1H, dd), 3.626 (1H, dd),
3.555 (1H, dd), 2.069 (3H, s), 2.047 (3H, s),
¹³C-NMR δ (D₂O, 25°C) : 177.81, 177.63, 177.30, 105.87, 105.69, 97.84,
93.34, 84.98, 82.41, 81.91, 81.25, 75.55, 75.44
75.20, 75.13, 75.02, 73.70, 72.68, 72.07, 71.10
71.01, 70.61, 69.82, 69.59, 69.29, 58.92, 57.94,
56.42, 25.09, 24.76
ケラタン硫酸五酯 (1I)
¹H-NMR δ (D₂O, 25°C) : 測定チャートを図4に示す。

¹³C-NMR δ (D₂O, 25°C) : 177.80, 177.32, 176.86, 105.92, 105.78, 104.94,

(1I)、ケラタン硫酸二酯 (1II) を得た。

こうして得られたケラタン硫酸四酯 (1)、ケラタン硫酸五酯 (1I) 及びケラ
タン硫酸二酯 (1II) を高速原子核終量分析法 (FABMS) により分析した。

(1) 開イオンFABMS (電イオノン高エネルギー衝撃質量分析法)

また、得られたケラタン硫酸四酯 (1)、ケラタン硫酸五酯 (1I) 及びケラ
タン硫酸二酯 (1II) を高速原子核終量分析法 (FABMS) により分析した。

ケラタン硫酸四糖(1) (は25mmol/ μ lの水溶液に、ケラタン硫酸五糖(11) (は40mmol/ μ lの水溶液に、ケラタン硫酸二糖(111) (は50mmol/ μ lの水溶液にそれぞれ調製され、それぞれ1.0 μ lを α -チオグリセロール (マトリクスとして使用) 1.0 μ lと混和して測定に用いた。測定はFinnigan MAT TSQ700 三連四重極質量分析計により行った。また断突原子にはキセノン (8kV) を用いた。結果を表3に示す。なお、表中の括弧内の数字はピークの相対強度 (%) を示す。

表3

試 料	分子間連イオン (m/z)			
	[$\text{M}+\text{Na}$] [*]	[$\text{M}+2\text{Na}-2\text{H}$] [*]	[$\text{M}+3\text{Na}-3\text{H}$] [*]	[$\text{M}+4\text{Na}-4\text{H}$] [*]
ケラタン硫酸四糖(1)				1111(11)
ケラタン硫酸五糖(11)				1133(100)
ケラタン硫酸二糖(111)				1322(22)
ケラタン硫酸二糖(11)	542(5)	564(100)	586(6)	[$\text{M}+2\text{H}-102$] [*] 462(23)

([$\text{M}+2\text{H}-102$]^{*}及び[$\text{M}+3\text{Na}-102$]^{*}はフラグメントイオンである。)

([$\text{M}+2\text{H}-102$]^{*}及び[$\text{M}+3\text{Na}-102$]^{*}はフラグメントイオンである。)

(2) 鹽イオンABMS (陰イオン高速原子衝撃質量分析法)

ケラタン硫酸四糖(1) (は25mmol/ μ lの水溶液に、ケラタン硫酸五糖(11) (は40mmol/ μ lの水溶液に、ケラタン硫酸二糖(111) (は40mmol/ μ lの水溶液にそれぞれ調製された。得られた各ケラタン硫酸オリゴ糖の水溶液をそれぞれ1.0 μ l、1.0 μ l、0.5 μ l取り、それぞれ1.0 μ lの α -チオグリセロール (マトリクスとして使用) と混和して測定を行った。測定はFinnigan MAT TSQ700 三連四重極質量分析計により行った。また断突原子にはキセノン (8kV) を用いた。結果を表4に示す。なお、表中の括弧内の数字はピークの相対強度 (%) を示す。

表5

	ケラタン硫酸四糖(1)	ケラタン硫酸五糖(II)	ケラタン硫酸二糖(III)
エンドトキシツ ^{a)}	6.5 pg/mgWT 1.9×10^{-4} EU/mgWT	0.2 pg/mgWT 5.8×10^{-5} EU/mgWT	0.2 pg/mgWT 5.8×10^{-5} EU/mgWT
核酸 ^{b)}	21.0 pg/mgWT	21.0 pg/mgWT	21.0 pg/mgWT
タンパク質 ^{c)}	1.8 μg/mgWT	1.8 μg/mgWT	1.8 μg/mgWT
プロテアーゼ ^{d)}	検出限界以下	検出限界以下	検出限界以下

注) a) : ケラタン硫酸オリゴ糖 1 mg当たりのエンドトキシン含有量で、トキシカ

ラー（商標）システム（生化学工業（株）製）を用いて測定。

EU : エンドトキシン単位 (Endotoxin Unit)

b) : DNAについてスレッショールド法 (DNA測定装置：スレッシュホールド（米国モレキュラーティバイス社製）) で測定。

c) : ヴシ血清アルブミンを標準物にしてローリー法で測定。

d) : FITC-カゼイソを基質として測定。

また、精製ケラタン硫酸四糖(1)、ケラタン硫酸五糖(II)及びケラタン硫酸二糖(III)中のヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸及びケラタン硫酸等のグリコサミノグリカン類の含有量を、セルロースアセテート膜（セバラシクス：富士写真フィルム（株）製）を用いた電気泳動法（緩衝液：0.1Mトリシン・ギ酸 pH 3.0、電流：0.5 mA/cm、泳動時間：30分、染色：0.5% アルシアンブルー溶液）で確認したこところ、どのケラタン硫酸オリゴ糖からも、いざれの化合物も検出されなかつた（検出限界以下）。

及びケラタン硫酸二糖(III)について急性毒性試験及び各種薬理作用試験を行つた。

5週令のICR系マウスの雌雄を用いて、実施例1で調製した精製ケラタン硫酸オリゴ糖のそれそれについて急性毒性試験を実施した。ケラタン硫酸四糖(1)、ケラタン硫酸五糖(II)及びケラタン硫酸二糖(III)のそれぞれPBS（リン酸鈉衛生食餌塩水）溶液を1.000 mg/kg又は2.000 mg/kgの用量で静脈内に投与し、投与後14日前、一般状態及び生死についての観察と体重の測定とを行つた。その後、動物を屠殺し、剖検を実施した。

その結果、死亡した動物は認められず、一般状態、体重、剖検においても異常は認められなかつた。

以上の結果から、上記ケラタン硫酸オリゴ糖のいずれをマウスの静脈内に投与した場合でも、最小死重量は2.000 mg/kg以上であると結論された。

(抗炎症作用試験)

(1) ウサギのハバイン誘発關節炎モデルを用いた抗炎症作用試験
ウサギのハバイン誘発關節炎モデルを用いて、關節液量を指標としてケラタン硫酸オリゴ糖の抗炎症作用について試験した。

(1-1) 両膝関節炎モデルを用いた、ケラタン硫酸四糖の關節腔内投与による抗炎症効果

体重約3 kgの日本白色在来種ウサギ（雌）の両膝關節腔内にハバインの生理食鹽水溶液(1%)を1.50 μl注入し、關節炎モデルを作製した。ハバイン注入後1日目に左側膝關節腔内に実施例1で調製した精製ケラタン硫酸四糖(1)のPBS溶液(1%)を1.50 μl (1.5mg/關節)注入し（以下、ケラタン硫酸四糖(1)投与足といふ）、また右側膝關節腔内にはPBSを1.50 μl注入した（以下、ケラタン硫酸四糖(1)非投与足といふ）。また、以下ケラタン硫酸四

実験例2

以上のようにして得られたケラタン硫酸四糖(1)、ケラタン硫酸五糖(II)

糖(1)を投与したウサギを投与群といふ）。また、ハバイン注入処理のみを施したウサギ（以下、対照群といふ）およびハバインを注入しない正常なウサギ（

以下、正常群という)についても同様に試験した。注入後7日目にウサギの耳介動脈から採血し、ヘパリン加血液を分離した。採血後ウサギを解剖し、両膝関節を分離した。2mlの生理食塩水液で3回、関節腔を洗浄し、回収関節液を探取した。血漿と回収関節液中のカルシウム濃度を測定し、下記の式から関節液量を算定した。

$$\text{関節液量}(\mu\text{l})/\text{関節} =$$

回収関節液中のカルシウム量($\mu\text{g}/\text{関節}$) / 血漿中のカルシウム濃度($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

以上の結果を表6に示す。なお表中のnは、実験に用いた各群のウサギの匹数を示す。

表6

	対照群(n=12)	投与群(n=8)		正常群(n=8)
		投与足	非投与足	
関節液量(μl) (標準偏差)	72.9 (111)	53.0 (147)	53.7 (130)	43.7 (63.3)
有意性*	-	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.01$

注)*:有意性は、Duncan多重比較検定による。

この結果から明らかなように、本発明によるケラタン硫酸四糖(1)投与群の関節液量は対照群のそれに比べて有意に少なく、ケラタン硫酸四糖(1)による関節炎の改善作用が認められた。

(1-3) 片膝関節炎モデルを用いた、ケラタン硫酸四糖の筋肉内投与による炎症効果

体重約3kgの日本白由在来種ウサギ(雌)の左膝関節腔内にババインの生理食塩水溶液(1%)を150μl注入し、右膝は無処置のままとして片膝関節炎モデルを作製した。ババイン注入後1日に、左膝部の筋肉内に英施例1で調製した精製ケラタン硫酸四糖(1)のPBS溶液(2%、1%および0.5%溶液)を150μl(1.0mg/kg、0.5mg/kg、0.25mg/kg)注入した(以下、ケラタン硫酸四糖(1)投与群という)。対照は、ケラタン硫酸四糖(1)のPBS溶液の代わりにPBSを150μl注入したものとした(以下、対照群といいう)。ハイハイ

ンを注入しない正常なウサギ(以下、正常群という)についても同様に試験した。
・注入後7日目に(1-1)と同じ方法で関節液量を算定した。
以上の結果を表7に示す。なお表中のnは、実験に用いた各群のウサギの匹数を示す。

表7

	対照群(n=12)	投与群(n=12)	正常群(n=8)
関節液量(μl) (標準偏差)	72.9 (111)	56.1 (65.8)	43.7 (63.3)
有意性*	-	$p < 0.01$	$p < 0.01$

注)*:有意性は、Duncan多重比較検定による。

この結果から明らかなように、本発明によるケラタン硫酸四糖(1)投与群の関節液量は対照群のそれに比べて有意に少なく、ケラタン硫酸四糖(1)の関節炎に対する改善作用が認められた。

(1-2) 両膝関節炎モデルを用いた、ケラタン硫酸四糖の筋肉内投与による炎症効果

(1-1)に記載された方法で関節炎モデルを作製し、ババイン注入後1日に左膝部の筋肉内に英施例1で調製した精製ケラタン硫酸四糖(1)のPBS溶液(1%溶液)を150μl(0.5mg/kg体重)注入した(以下、ケラタン硫酸四糖(1)投与群という)。対照は、ケラタン硫酸四糖(1)のPBS溶液の代わりにPBSを150μl注入したものとした(以下、対照群といいう)。ハイハイ

ンを注入しない正常なウサギ(以下、正常群という)についても同様に試験した。
・注入後7日目に(1-1)と同じ方法で関節液量を算定した。

以上の結果を表8に示す。なお表中のnは、実験に用いた各群のウサギの匹数を示す。

を示す。

表 8

	对照群 P B S (n=10)	ケラタン硫酸四糖(1)投与群(mg/kg)			正常群 (n=10) (n=9)
		0. 2 5 (n=9)	0. 5 (n=10)	1. 0 (n=9)	
関節液量(μl)	7.2 2 (70.0)	6.1 9 (70.6)	5.9 7 (68.9)	5.2 8 (53.1)	4.3 3 (46.1)
有意性*	-	p < 0.05	p < 0.01	p < 0.01	p < 0.01

注) * : 有意性は、T U K E Y 多重比較検定による。

この結果から明らかのように、本発明によるケラタン硫酸四糖(1)投与群の関節液量は対照群のそれに比べて有意に少なく、ケラタン硫酸四糖(1)による関節炎の改善作用が認められた。
(1-4) 片脚関節炎モデルを用いた、各種ケラタン硫酸四糖の筋肉内投与による抗炎症効果実験例1で調製した精製ケラタン硫酸四糖(1)及びケラタン硫酸二糖(1II)の1. 0% PBS溶液を1.50 μl (0.5mg/kg) 用いたこと以外は、(1-3)と全く同様の方法で実験を行った。結果を図5に示す。なお、図中、*、**及び***は、それぞれp<0.05、p<0.01、p<0.001であり有意があることを示す。また、鉛筆に用いたウサギは各群とも10匹であった。

この結果からケラタン硫酸四糖(1)投与群、ケラタン硫酸五糖(1I)投与群及びケラタン硫酸二糖(1II)投与群の関節液量はいずれも、対照群のそれにはべて有意に少なく、前記各ケラタン硫酸四糖による関節炎の改善作用が認めらる。

された。

(2) ラット足部触覚受け身アルサス反応を用いた抗炎症作用試験

III型アレルギー疾患モデルであるラット足部触覚受け身アルサス反応におけるケラタン硫酸四糖オリゴ糖の効果を検討した。すなわち、試験物質を投与したラットの足底にウサギ介節白アルブミン溶液を皮下投与し、さらに卵白アルブミンを尾静脈から注射して炎症(浮腫)を惹起し、試験物質の浮腫に対する抑制効果を調べた。

(試験物質の投与)

5週齢のC r j : SD系雌性ラットを、1週間予備飼育を行った後、約17時開始食を行い、炎症惹起前に試験物質として実施例1で調製した精製ケラタン硫酸四糖(1)、インドメタシン(シグマ社、Lot No.1970018)もしくはデキサメサン(万有製薬(株)、デカドロン注射液、Lot No.8D307P)、あるいは陰性对照として生理食塩液((株)大塚製薬工業、Lot No.K372)を投与した。ケラタン硫酸四糖(1)及びデキサメサンは生理的食塩液に溶解させたものを、インドメタシンは0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na : 和光純薬工業(株)、Lot No.PIN1418)に溶解させたものを、各自使用した。投与容量は全て体重100g当たり0.5mlとした。また、投与経路としては、ケラタン硫酸四糖(1)、生理的食塩液およびデキサメサンは尾静脈より投与し、インドメタシンは経口投与とした。なお、インドメタシンを除く葉物はブラインド法により投与した。

(i) 炎症惹起5分前投与
① 生理食塩水(陰性对照)
② ケラタン硫酸四糖(1) 1mg/kg
③ ケラタン硫酸四糖(1) 3mg/kg
④ ケラタン硫酸四糖(1) 10mg/kg
(ii) 炎症惹起30分前投与

⑤ インドメタシン(陽性对照) 5mg/kg

(iii) 炎症惹起3時間前投与

⑥ケラタン硫酸四糖 (1) 1mg/kg
 ⑦ケラタン硫酸四糖 (1) 3mg/kg
 ⑧ケラタン硫酸四糖 (1) 10mg/kg
 ⑨デキサメサン (雌性対照) 1mg/kg

(炎症の惹起)

上記の各ラットの足底部にウサギ抗卵白アルブミン血清を皮下投与し、さらに卵白アルブミンを尾静脈から注射して炎症(足腫脹)を惹起した。用いた抗血清は次のようにして調製した。ウサギの背部皮内に2%卵白アルブミン(Egg Albumin n 5 × Cryst. Lot. No. P93601, 生化学工業(株))含有生理的食塩液とフロント・コンプレート・アジュバント(FCA)との等量混合液(エマルジョン)を1ml(1匹あたり卵白アルブミン1.0mg)を週1回、計3回注射して感作した。最終感作後から約3-4日後に採血して抗血清を得た。得られた抗血清について重層法により抗体価を測定した。すなわち、生理的食塩液で希釈した抗血清と1%卵白アルブミン含有生理的食塩液(1mg/ml)との白色沈澱反応を指標として測定した。その結果、得られた抗血清の抗体価は×2¹であった。

各試験物質を投与したラットの左後肢足底に、各筋肉に設定された時間が経過後、4倍に希釈した抗血清を0.1ml皮下投与した。次に、0.5%卵白アルブミン含有生理的食塩液(25mg/5ml/kg)を尾静脈より投与して炎症を惹起した。炎症惹起前および惹起後1、2、3および4時間の各群の処置足の容積を足容積測定装置(TK-101、ユニコム(株))を用いて測定し、惹起前値との差より足腫脹率を求め、さらに試験物質投与群の对照群に対する消腫抑制率を算出した。得られた個々の消腫率について最小有意差検定より平均値の検定を行った。各投与群における足腫脹率及び浮腫抑制率を表9に、炎症惹起5分前及び3時間前に薬物を投与した群の足腫脹率をそれぞれ図6、7に示した。図中、*及び**は、それぞれp<0.05、p<0.01で有意差があることを表す。

試験物質	投与量 (mg/kg)	1時間後 浮腫量 (ml/g)	2時間後 浮腫量 (ml/g)	3時間後 浮腫量 (ml/g)	4時間後 浮腫量 (ml/g)
生理的食塩液(对照)	-	40.9±3.4	46.3±4.4	51.2±3.7	44.9±2.5
生理的食塩液4錠(1)	1	29.2±1.3** (28.7)	29.4±2.9** (36.5)	42.3±3.6** (17.0)	39.8±3.0 (11.3)
生理的食塩液5分前投与	10	34.4±5.2 (15.8)	42.3±4.2 (8.6)	46.1±2.2 (9.5)	37.2±3.1* (12.1)
生理的食塩液30分前 投与	5	35.4±1.6 (13.5)	38.2±2.9* (17.5)	46.4±2.8 (9.0)	38.7±3.1* (13.8)
生理的食塩液4錠(1)	1	35.4±1.6 (13.4)	42.1±2.6 (8.4)	46.7±2.6 (8.4)	38.8±3.5* (15.5)
生理的食塩液3時間前 投与	10	36.5±3.5 (10.6)	42.3±2.6 (8.4)	46.1±2.6 (8.4)	33.9±2.2** (22.4)
生理的食塩液3時間後 投与	1	44.2±3.4 (8.1)	46.1±2.6 (8.1)	46.1±2.6 (8.1)	34.5±3.6** (23.2)
⑥ケラタン硫酸四糖 (1)	1mg/kg	21.3±3.1** (47.8)	31.6±2.2** (31.7)	30.7±1.5** (39.9)	18.8±2.0** (58.1)
⑦ケラタン硫酸四糖 (1)	3mg/kg	36.5±3.5 (10.6)	40.1±2.8** (23.5)	41.5±1.8** (18.7)	34.5±3.6** (23.2)
⑧ケラタン硫酸四糖 (1)	10mg/kg	38.7±3.1* (13.8)	38.7±3.1* (13.8)	38.7±3.1* (13.8)	38.7±3.1* (13.8)
⑨デキサメサン (雌性対照)	1mg/kg	38.7±3.1* (13.8)	38.7±3.1* (13.8)	38.7±3.1* (13.8)	38.7±3.1* (13.8)

表9

その結果、陰性対照である生理的食塩液投与群では、1時間後の足腫脹率が4.0-9%であったのに対し、ケラタン硫酸四糖(1)一錠投与5分前投与群では、2.9-3.4-4.4%であり、1mg/kg投与群および10mg/kg投与群には有意差が認められた。炎症惹起1時間後以降は、用血栓抑制効果はみられなかつたが

(39) 4時間後においても3mg/kg投与群および10mg/kg投与群で3.7、2%および3.5、4%と有意に低値であった。また、ケラタン硫酸四糖(1)-炎症惹起3時間前投与群では、炎症惹起3時間後に有意な差はみられなかったが、2時間後に3mg/kg投与群で3.5、3%、3時間後に10mg/kg投与群で4.1、5%、さらにも4時間後には1mg/kg投与群でも3.8%と有意に低値を示した。また、インドメタシン投与群では、2時間後及び4時間後に有意に低値を示した。またデキサメサン投与群では、1～4時間後にかけていずれの測定期点でも有意に低値であった。

足部創傷処理群は、インドメタシン投与群では、1～4時間後にかけて9～17.5%であったのにに対し、ケラタン硫酸四糖(1)-5分前投与群では、8、6～3.6、5%の高い足部創傷抑制群が算出された。また、ケラタン硫酸四糖(1)-3時間前投与群では、-8、1～24、4%であった。一方、デキサメサン投与群では、3.1、7～5.8、1%の低い足部創傷抑制群であった。

(3) ラットのカラダニン創傷炎モデルを用いた抗炎症作用試験

抗炎症剤の評価に一般的に用いられる炎症モデルであるラットのカラダニン脛膜炎モデルを適用して、ケラタン硫酸オリゴ糖の作用を検討した。

試験には、体重約150～170gのS.D.ラット(雄)3匹を使用した。
①カラダニン(シグマ社製)を生理食塩液で2%濃度に溶解し、0.8μlのアールターで過濾をした。得られたカラダニン溶液を1.00ml匹の割合いで、ラットの脛膜内に投与し、脛膜炎モデルを作製した。
上記脛膜炎モデルラット19匹に、P.B.Sに溶解したケラタン硫酸四糖(1)を、2.0mg/kgまたは1.0mg/kgの投与量で皮下(S.C.)投与した。また、陽性対照として上記ラット8匹にステロイド剤(酢酸デキサメサン万有製薬(株))を、陰性対照である1.50mg/kgで皮下投与した。陰性対照として、1.0匹にP.B.Sを皮下投与した。各々の投与群は、カラダニン投与直後に行つた。投与区分

をまとめると、表1の通りである。

表10

投与群	被検物質	投与用量	投与部位
① n=10	カラタ硫酸四糖(1)	2mg/ml	10mg/kg s.c.
② n=9	カラタ硫酸四糖(1)	4mg/ml	20mg/kg s.c.
③ n=8	酢酸デキサメサン(デキサメサン)	30μg/ml	150μg/kg s.c.
④ n=10	PBS(陰性対照)		s.c.

各々のラットを、1-カラダニン投与後6時間後に解剖した。ラットの胸腔を開放し、ソーン付き2mlシリングで貯留した胸水を採取した。その後、1mlの生理食塩液で胸腔内を洗浄し、洗浄液を回収された胸水液量を測定し、さらに胸水中の白血球数(細胞数)を自動血球計算装置で測定した。結果を、各々図8、9に示す。図中、*及び**は、それぞれp<0.05、p<0.01(pはダントンテストにおける危険率)で有意差があることを表す。

図8に示されるように、ケラタン硫酸四糖(1) 10mg/kg投与群の胸水液量は、陰性対照群と比べ有意に少なかったが、ケラタン硫酸四糖(1) 20mg/kg投与群と比べ差が無く、用量依存性は認められなかった。酢酸デキサメサン投与群の胸水液量は、陰性対照群に比べて有意に少なかった。また、胸水中の白血球数は、ケラタン硫酸四糖(1) 10mg/kg投与群及び20mg/kg投与群の胸水液量は、対照群と比べ有意に少なく、用量依存的に減少した(図9)。酢酸デキサメサン投与群の白血球数は、対照群と比べ有意に少なかった(図9)。

上記結果から、カラタ硫酸四糖(1)はラットのカラダニン脛膜炎モデルに対する抗炎症作用を示すことがわかる。

(4) モルモット好中球の活性化器(O₂-)産生抑制作用
生理食塩水に溶解したグリコーゲン(Type II, Oyster; シグマ社製)の0.2%

%水溶液を高压蒸気滅菌後、5週齢のHardley系モルモット(雄; 日本エスエルシー社より購入)の脛膜内に2.0ml投与した。投与の16時間後にモルモット

(41) を脱血死させ、ヘパリン10U/m1を含む生理食塩液20mlを頸腔内に注入し、頸腔吸出液を回収した。以後、インキュベート時以外は全て冰冷下で操作した。回収した液を1000rpmで10分間遠心分離し、得られた上清液を精製水で30倍希釈させた後、これを2倍濃度のハシクス液(フェノールレッド不含;日本製薬製)で等量にもどし、更に1000rpmで10分間遠心分離した。得られた沈澱をハシクス液に懸濁させ、遠心分離する操作を2回行い、好中球を得た。

採取したモルモット好中球をハシクス液に懸濁させ、血球測定装置(System K-2000;東邦医療電子(株)製)により白血球数を測定し、ハシクス液で2×10⁶個/mlに希釈したものと細胞浮遊液として測定に用いた。細胞浮遊液1mlと上記実施例1で調製された精製ケラタン硫酸四糖(ケラタン硫酸四糖(1)、ケラタン硫酸五糖(1)または精製ケラタン硫酸二糖(1))の10μlを混和した後、37℃で1時間のブレンキンキューベーションを行った。その後、これに1.6 mMのチトクロームc(Type III, Horse Heart; シグマ社製)液5.0μl、1.0μMのN-ホルミル-Lys-Lys-Phe(以下FMLPともいう。シグマ社製)10μlを細胞に加え、混和した。これを37℃で10分間インキュベートした後、氷冷で得られた上清を取り出し、その5.50nmにおける吸光度を測定して、10分間のインキュベート後の2×10⁶細胞当たりの還元型チトクロームc量を求めた。活性酸素(O₂⁻)が産生されると、還元型チトクロームc量が増加する。なお、粗抽出ヒトSOD(recombinant human superoxide dismutase)を終濃度で2.0μg/ml添加したものとランクとした。また用いたモルモットは6匹であり、それぞれ独立に実験した。対照群(ケラタン硫酸四糖が付加しないもの)における還元型チトクロームc量を100%としたときの各ケラタン硫酸四糖の割合をそれぞれ算出し、对照群との差を活性酸素(O₂⁻)産生抑制率(%)として算出し、さらに各実験の平均を求めた。結果を図10に示す。なお、図中の各ケラタン硫酸四糖(1)は0.01、0.1及び1.0mg/mlの濃度で、濃度依存的に強著に活性酸素(O₂⁻)産生を抑制していることがこの結果より、ケラタン硫酸四糖(1)は0.01、0.1及び1.0mg/mlの濃度で、濃度依存的に強著に活性酸素(O₂⁻)産生を抑制していることが

(42) わかり、これは、ケラタン硫酸四糖(1)が抗炎症作用を有することを支持するものである。また、ケラタン硫酸二糖(1II)およびケラタン硫酸五糖(1I)も、わずかながら活性酸素の産生抑制作用が認められた。この結果から、ケラタン硫酸オリゴ糖は好中球の活性酸素(O₂⁻)の産生を抑制することにより、抗炎症作用を発揮することが示唆された。

(抗アレルギー作用)

アレルギー性結膜炎を惹起させたモルモットに、各種ケラタン硫酸オリゴ糖を点眼し、その効果を検討した。

(1) アレルギー性結膜炎に対するケラタン硫酸四糖(1)の効果

トルエン・ジソシアナート(toluene diisocyanate, 以下TDIという)を酢酸エチルで10%濃度に希釈した。得られた10%TDIを体重約900～1000gのHartley系モルモット(雌)10匹の左右鼻前庭(10μl/1匹)に1日1回、5日間投与し、TDI感作モデルの左眼に、実施例1で調製した精製ケラタン硫酸四糖(1)のPBS溶液(100mg/ml)を、右眼には対照としてPBSを点眼した。点眼用器具は、いずれも点眼容器から1μl滴(48±4.6μl(S.D.))とした。10分後、両眼に10%TDIを6.5μl点眼し、結膜炎を惹起させた。5分間放置した後、さらに左眼にケラタン硫酸四糖(1)のPBS溶液(100mg/ml)を、右眼にはPBSを点眼した。1.5分後、両眼を観察した。結膜炎の程度は、充血、浮腫、流涙の3項目について0、+1、+2、+3の4段階の評点で段階付けをした。結果として評点の平均値を標準偏差と共に図11に示す。尚、図中*は、p<0.05(pはχ²検定における危険率)で有意差があることを表す。

その結果、ケラタン硫酸四糖(1)は、観察した充血、浮腫、流涙の3項目全てにおいて抑制する傾向にあり、特に浮腫については対照に比べ有意に抑制した。

(2) アレルギー性結膜炎に対する各種ケラタン硫酸オリゴ糖の効果

上記(1)と同様に作成した各群TDI感作モデルの左眼に、被検物質として上記実施例1で調製した精製ケラタン硫酸二糖(1II)、ケラタン

儀四筋（1）またはケラタン硫酸五糖（II）のPBS溶液（いずれも6.0mg/ml）を点眼し、右眼には対照としてPBSを点眼した。結膜炎の程度は上記（1）と同様に評価した。結果として評点の平均値を標準偏差と共に図1.2に示す。尚、図中*は、 $p<0.05$ (ρ は χ^2 検定における危険率) で有意差があることを表す。

その結果、ケラタン硫酸二糖（III）、ケラタン硫酸四糖（1）及びケラタン硫酸五糖（1）のいずれもが、光血、浮腫、流涙の3項目全てにおいて、これを抑制する傾向にあり、特にケラタン硫酸四糖（1）については、浮腫を有意に抑制する効果を示すことがわかった。

(3) アレルギー性結膜炎に対する各種濃度のケラタン硫酸四糖（1）の効果
上記（1）と同様に作成した各群10匹ずつのTDDI感作モデルの左眼に、被検物質として実施例1で調製した精製ケラタン硫酸四糖（1）を各種濃度（10mg/ml、3mg/ml、1.5mg/mlまたは7.5mg/ml）で含有するPBS溶液を点眼し、右眼には対照としてPBSを点眼した。結膜炎の程度は上記（1）と同様に評価した。結果として評点の平均値を標準偏差と共に図1.3に示す。尚、図中*は、 $p<0.05$ (ρ は χ^2 検定における危険率) で有意差があることを表す。

その結果、いずれの濃度のケラタン硫酸四糖（1）PBS溶液においても、光血、浮腫、流涙の3項目全てについて抑制する傾向にあり、特に6mg/ml、3mg/ml及び1.5mg/mlの濃度のケラタン硫酸四糖（1）PBS溶液は、浮腫について有意な抑制効果を示した。

(免疫調節作用・細胞の分化誘導作用)・アボトーシス誘導作用
自己免疫疾患モデルマウスであるMRLマウスに対する、ケラタン硫酸オリゴ糖の効果を検討した。

(1) リンパ節重筋抑制作用
(1-1) MRLマウスにおけるケラタン硫酸四糖（1）の4週間反復筋肉内投与試験
MRL-1-pr/lprマウスに、実施例1で調製した精製ケラタン硫酸四糖（1）のPBS溶液(100mg/ml)を1回10mg/kg体重となるように（以下、投与群という）、また対照としてPBSを、それぞれ5回/週で4週間、大腿筋内に注射した。

この結果、いずれの投与量のケラタン硫酸四糖（1）投与群においても第1回筋肉内に注射した。その後ケラタン硫酸四糖が認められ、特に5mg/kg投与群においては精細群と比較して有意な重筋抑制効果が認められ、ケラタン硫酸四糖（1）が免疫調節作用を有することが示唆された。

その後マウスを解剖し、肺臍および腸間膜リンパ節の重量を測定し平均重量を求めた。結果を標準偏差と共に表1.1に示す。なお表中のnは、用いたマウスの匹数を示す。

表1.1

	脾 重 量 (mg)	腸間膜リバ [®] 節 重 量 (mg)
対照群(n=8)	1013 ± 233	1563 ± 352
投与群(n=9)	704 ± 148	1338 ± 311

その結果、ケラタン硫酸四糖（1）を注射した群において、肺臍および腸間膜リンパ節の重量均加抑制傾向が認められ、ケラタン硫酸四糖（1）の免疫調節作用が示唆された。

(1-2) MRLマウスにおけるケラタン硫酸二糖（III）の2.8日間反復筋肉内投与試験

MRL-1-pr/lprマウスに、実施例1で調製した精製ケラタン硫酸二糖（III）のPBS溶液を1回1mg/kg体重、5mg/kg体重または25mg/kg体重となるようないし、3mg/ml、1.5mg/mlまたは7.5mg/mlで含有するPBS溶液を点眼し、(以下、それぞれ1mg/kg投与群、5mg/kg投与群、25mg/kg投与群という)、また对照としてPBSを（以下、対照群ともいう）、それぞれ7回/週で4週間、大腿筋内に注射した。その後ケラタン硫酸二糖が認められ、ケラタン硫酸二糖（III）が有意な重筋抑制効果と共に図1.4に示す。かお引用いたマウスは各群とも6匹であった。また、図中*は、 $p<0.05$ (ρ はBonferroni多重比較検定における危険率) で有意差があることを示す。

この結果、いずれの投与量のケラタン硫酸二糖（III）投与群においても第1回筋肉内に注射した。その後ケラタン硫酸二糖が認められ、特に5mg/kg投与群においては精細群と比較して有意な重筋抑制効果が認められ、ケラタン硫酸二糖（III）が免疫調節作用を有することが示唆された。

(1-3) MRLマウスにおけるケラタン硫酸二糖（III）の5.6日間反復筋肉内投与試験
MRL-1-pr/lprマウスに、実施例1で調製した精製ケラタン硫酸二糖（III）のPBS溶液(100mg/ml)を1回10mg/kg体重となるように（以下、投与群という）、また対照としてPBSを、それぞれ5回/週で4週間、大腿筋内に注射した。

内投与試験

MR L-1pr/lpr マウスに、実施例 1 で調製した精製ケラタン硫酸二糖 (III) の PBS 液を 1 回 2.5mg/kg 体重、5mg/kg 体重または 10mg/kg 体重となるように (以下、それぞれ 2.5mg/kg 投与群、5mg/kg 投与群、10mg/kg 投与群といふ)、また対照として PBS (以下、対照群ともいふ) を、それぞれ 7 回／週で 8 週間、大腿筋内に注射した。その後マウスを解剖し、股関節リンパ節及び頸下リンパ節の重さを測定しそれぞれ平均重さを求めた。股関節リンパ節に関する結果を図 1 に、頸下リンパ節に関する結果を図 1 6 に、それぞれ標衡群と共に示す。

なお用いたマウスは各群とも 7 匹である。

この結果、ケラタン硫酸二糖 (III) の 2.5mg/kg 投与群において腸間膜リンパ節の重量抑制効果が、10mg/kg 投与群において腸間膜リンパ節及び頸下リンパ節の重圧増加抑制効果が認められ、これによりケラタン硫酸二糖 (III) の免疫調節作用が示唆された。

(2) 細胞の分化誘導作用

(2-1) 細胞染色濃度を指標とした細胞の分化誘導の解析
MR L-1pr/lpr マウスに、実施例 1 で調製した精製ケラタン硫酸二糖 (III) の PBS 液を 1 回 1mg/kg 体重、5mg/kg 体重または 25mg/kg 体重となるように (以下、それぞれ 1mg/kg 投与群、5mg/kg 投与群、25mg/kg 投与群といふ)、また対照として PBS (以下、対照群ともいふ) を、それぞれ 7 回／週で 4 週間、大腿筋内に注射した。その後マウスを解剖し、股関節リンパ節及び頸下リンパ節の切片標本 (HE 染色) を作製した。この標本について像解析装置 (PIAS 装置) を用いて、単位面積当たりの染色濃度を解析した。なお、未分化の細胞は細胞質の割合が多く、核も薄く染色されるために、単位面積当たりの染色濃度は低い。分化した細胞は、核の占める割合が大きく、かつ核も強く染色されたため、単位面積当たりの染色濃度は高い。

腸間膜リンパ節における解析結果を図 1 7 に、頸下リンパ節における解析結果を図 1 8 に、それぞれ標衡群と共に示す。尚、図中 * * は、p<0.01 (p<Bonferroni 多重比較検定における危険率) で有意差があることを表す。なお、用いた

マウスはいずれも 6 匹であった。

この結果、上記いずれの投与量のケラタン硫酸二糖 (III) 投与群においても単位面積当たりの染色濃度の增加 (相対明度の減少) が認められ、特に 5mg/kg 投与群及び 25mg/kg 投与群においては、対照群と比較して有意な染色濃度の増加が見られた。このことは、ケラタン硫酸二糖 (III) によって分化した細胞が増加したことを示しており、ケラタン硫酸二糖 (III) が細胞の分化誘導作用を有することが示された。

(2-2) リンパ節のリンパ球表面抗原を指標とした分化誘導の解析
MR L-1pr/lpr マウスに、実施例 1 で調製した精製ケラタン硫酸二糖 (III) の PBS 液を 1 回 2.5mg/kg 体重、5mg/kg 体重または 10mg/kg 体重となるよう (以下、それぞれ 2.5mg/kg 投与群、5mg/kg 投与群、10mg/kg 投与群といふ)、また対照として PBS (以下、対照群ともいふ) を、それぞれ 7 回／週で 8 週間、大腿筋内に注射した。その後マウスを解剖し、リンパ節を cell strainer (rat con 2350) 上ですりつぶし、リンパ球細胞を調製した。調製した各投与群のリンパ群についてそれぞれ抗 CD 3 抗体 (生化学工業 (株) 型) 及び抗 CD 4 抗体 (ファーミンジエン型) を用いた二重免疫染色、抗 CD 3 抗体と抗 CD 8 α 抗体 (CD 4 及び CD 8 α T 細胞に対する細胞表面抗原であり、B 2.2 0 は B 細胞に発現する細胞表面抗原である。また、ヌル (null) のリンパ球細胞には、これら細胞表面抗原の発現は見られないことが知られている。

金リンパ球細胞に対する、CD 3 及び CD 4 阳性細胞 (以下、CD3+CD4+細胞ともいふ；主にヘルパー T 細胞) の割合 (%) を標衡群と共に図 1 9 に、CD 3 及び CD 8 α 阳性細胞 (以下、CD3+CD8α+細胞ともいふ；主にサプレッサー T 細胞及び細胞障害性 T 細胞) の割合 (%) を標衡群と共に図 2 0 に、また CD 3 及び B 2.2 0 阳性細胞 (以下、CD3+H220+細胞ともいふ；T 細胞でありながら B 細胞の表面抗原を有する異常な細胞) の割合 (%) を標衡群と共に図 2 1 にそれぞれ

れ示す。尚、図中*は、 $p<0.05$ (p はRyan多重比較検定における危険率) で有意差があることを表す。なお用いたマウスは各群とも7匹であった。

図1より、ケラタン硫酸二糖(111)の10mg/kg投与群において、対照群、2.5mg/kg投与群及び5mg/kg投与群に対する有意なCD3+CD4+細胞の増加が見られることがわかる。このことは、ヌル(null)のリンパ球細胞が相当量のケラタン硫酸二糖(111)の投与によりCD3+CD4+細胞に分化したことを見ている。

図2より、ケラタン硫酸二糖(111)の10mg/kg投与群において、対照群、2.5mg/kg投与群及び5mg/kg投与群に対して、CD3+CD8a+細胞の増加が見られることがある。このことは、ヌル(null)のリンパ球細胞が相当量のケラタン硫酸二糖(111)の投与によりCD3+CD8a+細胞に分化したことを見している。

図2より、ケラタン硫酸二糖(111)の10mg/kg投与群において、対照群、2.5mg/kg投与群及び5mg/kg投与群に対するCD3+CD220+細胞の減少が見られた。このことは、相当量のケラタン硫酸二糖(111)の投与によりCD3+CD220+細胞という異常な細胞が減少することを見ており、正常なリンパ球細胞への分化が誘導されたことを支持する結果である。

以上の結果から、ケラタン硫酸二糖(111)に細胞の分化誘導作用があることが示された。

(3) アボトーシス誘導作用

MRI-1-[³H]IP₃Rマウスに、実施例1で調製した精製ケラタン硫酸二糖(111)のPBS溶液を1回1mg/kg体重、5mg/kg体重または25mg/kg体重となるよう(以下、それぞれ1mg/kg投与群、5mg/kg投与群、25mg/kg投与群という)、また対照としてPBSを(以下、対照群ともいう)、それぞれ7回/週で4週間、大腿筋肉内に注射した。その後マウスを解剖し、頸下リンパ節の切片標本(Gavrielisの)方法により染色: Terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated nick end labeling method: J. Cell Biol., 119, 493-501(1992) を作製した。

この染色方法は、断片化したDNAの末端を検出することにより、アボトーシスを引き起きた細胞が検出できる方法である。この標本を光学顕微鏡で観察し、単位面積当たりの染色細胞数(アボトーシスを起こした細胞。以下単にアボトーシス)

細胞ともいいう。)を測定した。結果を標地群と共に図22に示す。尚、図中*は $p<0.05$ 、**は $p<0.01$ (p はBonferroni多重比較検定における危険率)で有意差があることを表す。なお用いたマウスは各群とも6匹であった。

この結果から、いずれの投与量のケラタン硫酸二糖(111)投与群においてもアボトーシス細胞数の増加が認められ、特に5mg/kg投与群においては、対照群に対して有意なアボトーシス細胞数の増加が認められることがわかる。

また、上記各群のマウスの頸下リンパ節の切片標本(H&E染色)も作製し、光学顕微鏡でアボトーシス小体(apoptotic body)の有無を観察した。その結果上記いずれの投与量のケラタン硫酸二糖(111)投与群にもアボトーシスマサ体が散在しているのが観察された。

これらの結果より、ケラタン硫酸二糖(111)が、アボトーシスマサ作用を有する事が示された。

以上の結果から、ケラタン硫酸オリゴ糖の免疫調節作用、細胞の分化誘導作用およびアボトーシスマサ作用が確認された。

実施例3 次薬

常法により日本薬局方製水軟膏に、実施例1で調製した精製ケラタン硫酸四糖(11)を10mg/mLの濃度で溶解し、軟膏を調製した。本軟膏は、抗炎症剤、抗アレルギー剤のいずれにも使用できる。

実施例4 点眼剤

常法により、リン酸塩でpH 6.8~7.6に調整した生理食塩液に、実施例1で調製した精製ケラタン硫酸四糖(11)を10mg/mLの濃度で、またヒアルロン酸ナトリウムを2mg/mLの濃度で溶解し、点眼剤を製造した。本点眼剤は、抗炎症剤、抗アレルギー剤のいずれにも使用できる。

実施例5 リガル

実施例1で調製した精製ケラタン硫酸四糖(11)を10mg/mLの濃度で、レシチンを含有するリガル(アクアソーム)ⅢA、日光ケミカルズ株式会社)に溶解し、超音波処理により包接させた。本リガルは、抗炎症剤、抗アレルギー剤、免疫調節剤、分化誘導剤、アボトーシスマサ作用のいずれにも使用できる。

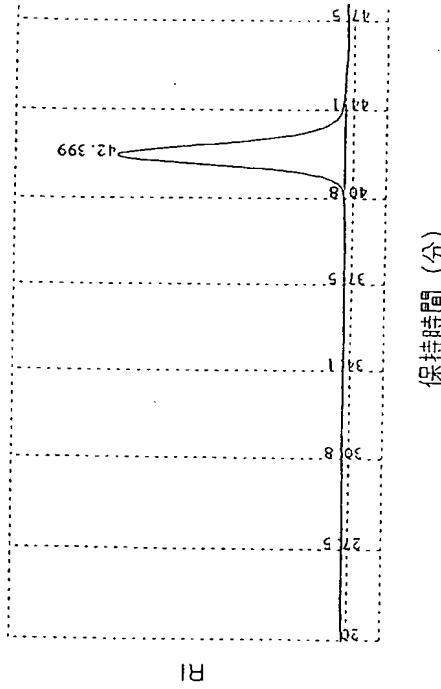
実施例6 注射剤

常法により、リン酸塩でpH 6.8～7.6に調整した生理食塩液に、実施例1で調製した精製ケラタン硫酸二鉄(III)を1.0 mg/mℓの濃度で溶解し、0.22 μmのフィルターで無菌濾過することにより注射剤を製造した。本注射剤は、抗炎症剤、抗アレルギー剤、免疫調節剤、分化誘導剤、アボトーシス誘導剤のいずれにも使用できる。

薬理上の利用性

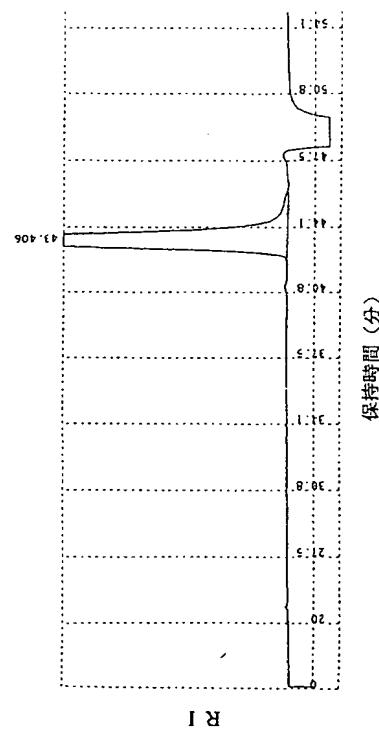
本発明の精製高硫酸化ケラタン硫酸オリゴ糖類は極めて精製度が高く、エンドキシン、核酸、蛋白質、プロテアーゼ、上記オリゴ糖以外の他のグリコサミノグリカン類等を実質的に含まないため、新規な抗炎症剤等の医薬品として利用できる。

[図1] 図1



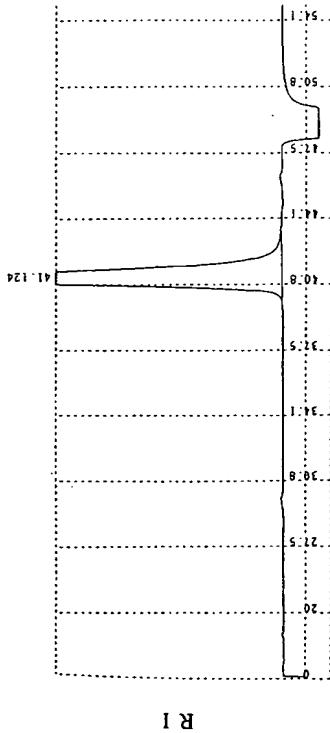
保持時間(分)

[図3] 図3



保持時間(分)

[図2] 図2



[図2] 図2

図4

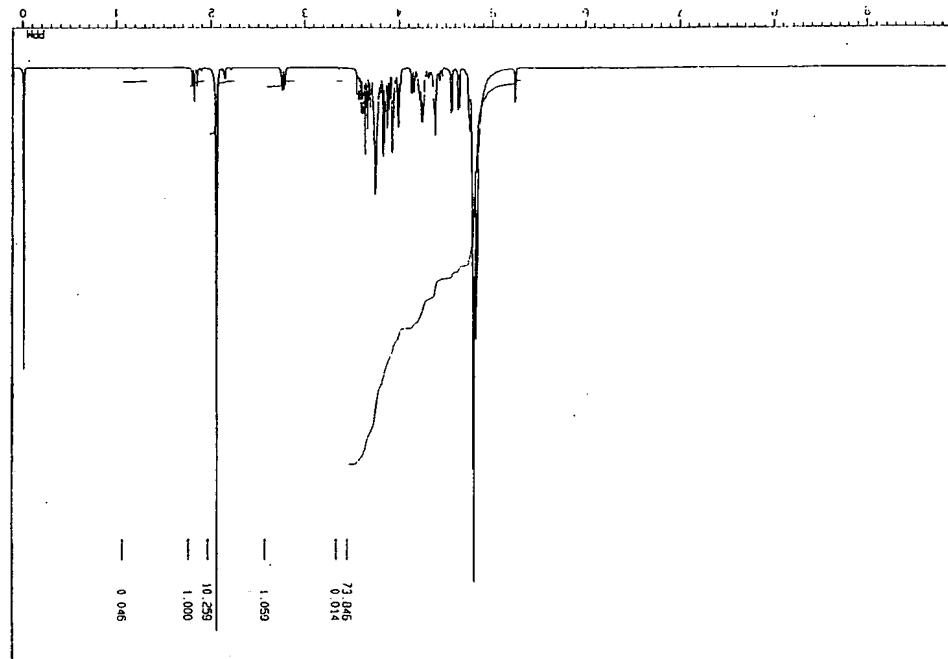


図5

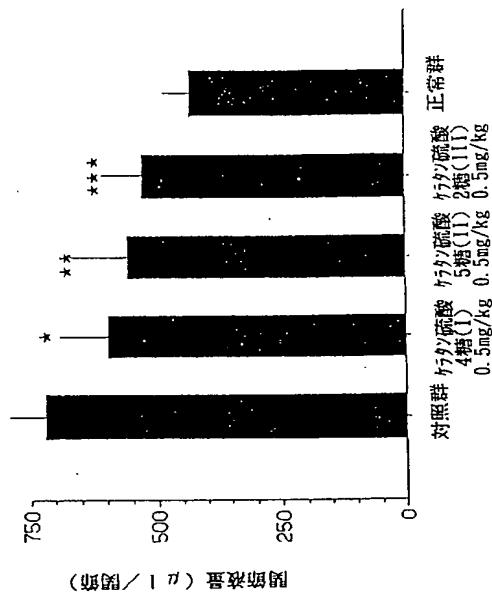
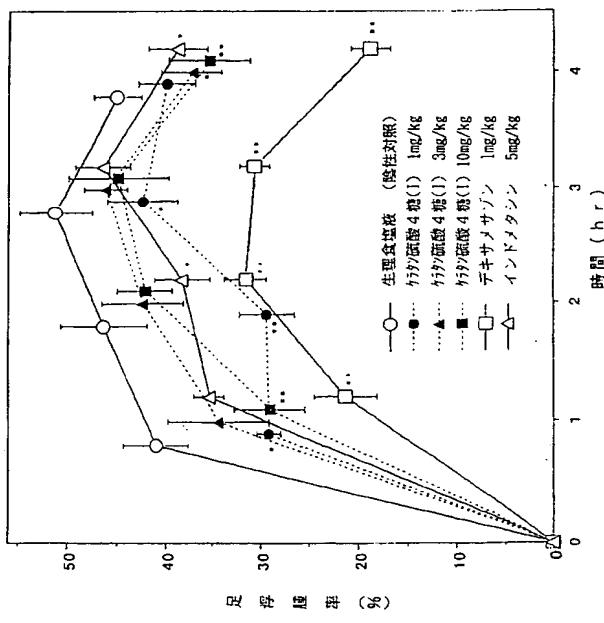
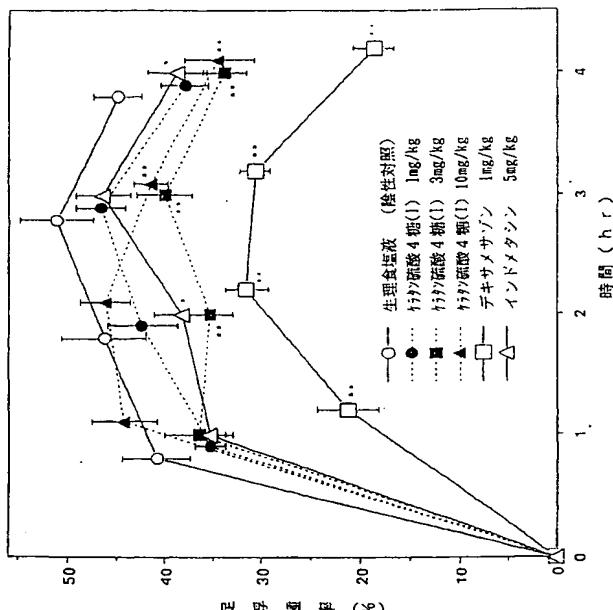


図5

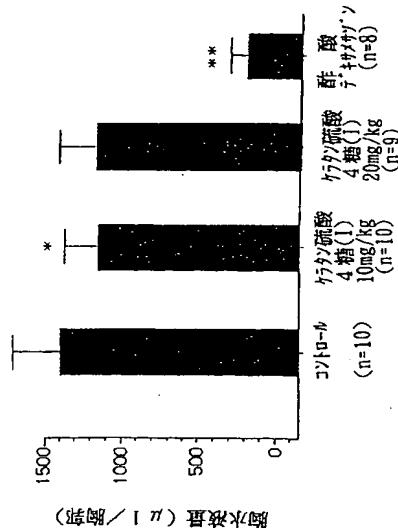
[図6]



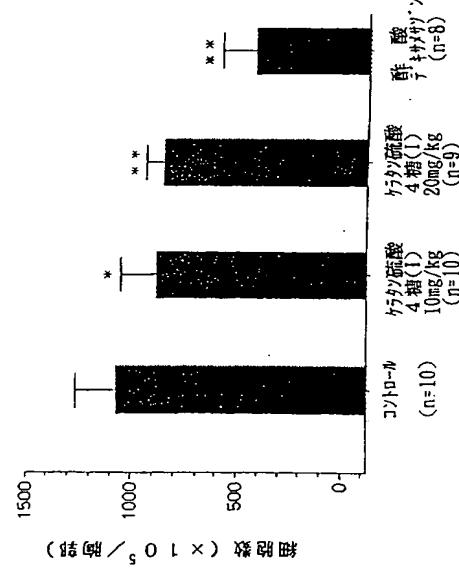
[図7]



[図8] 図8

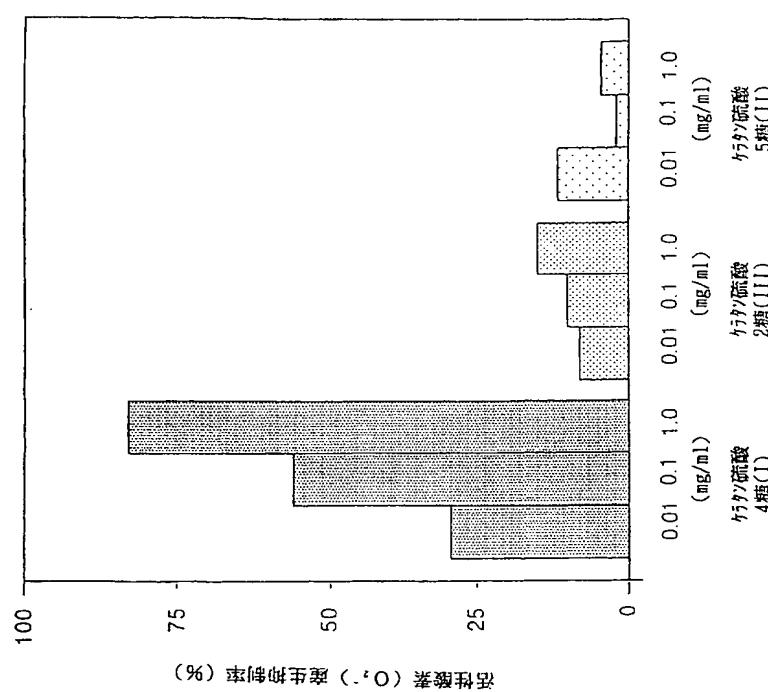


[図9] 図9

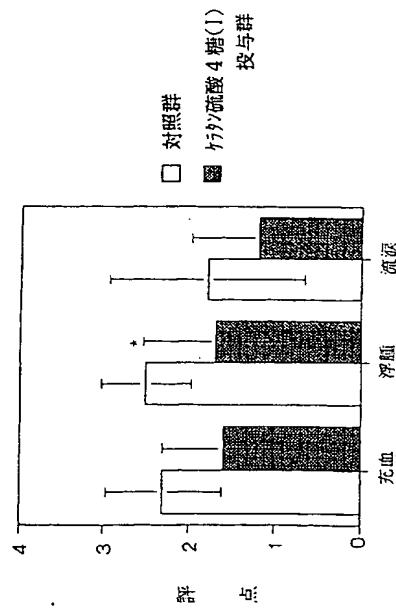


[図9] 図9

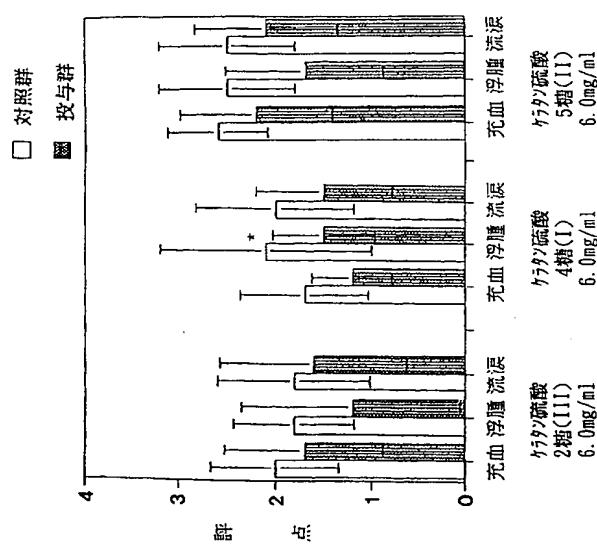
[図10] 図10



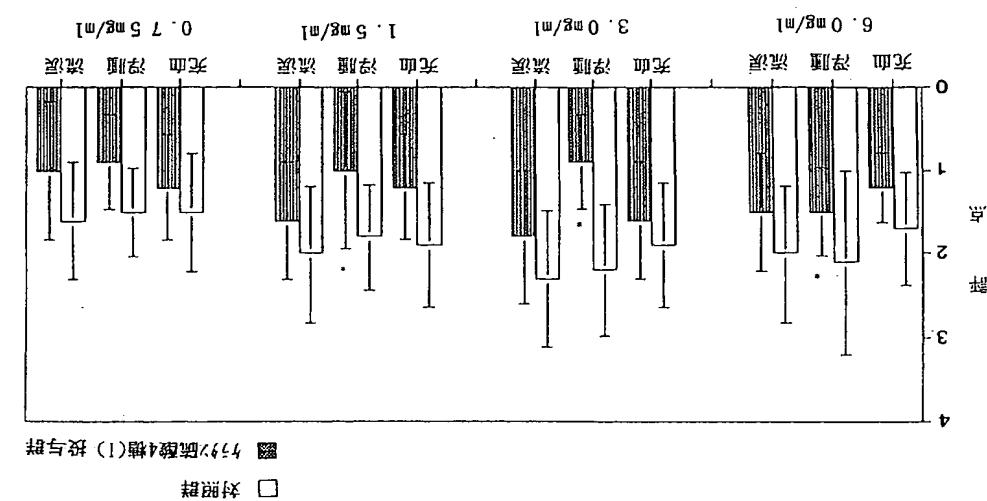
[図11] 図11



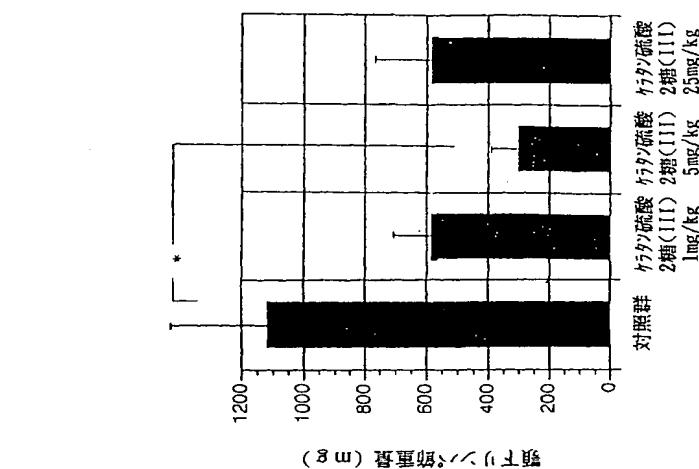
[図12] 図12



[図13] 図13



[図14] 図14



(62)

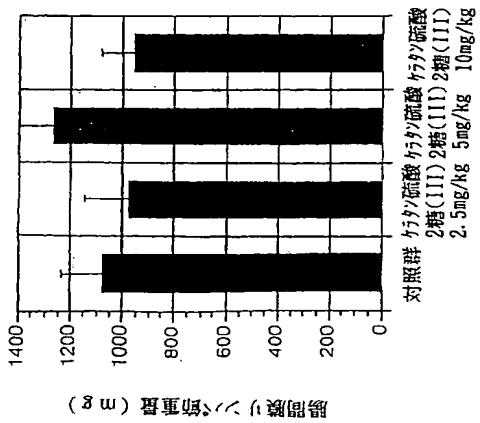
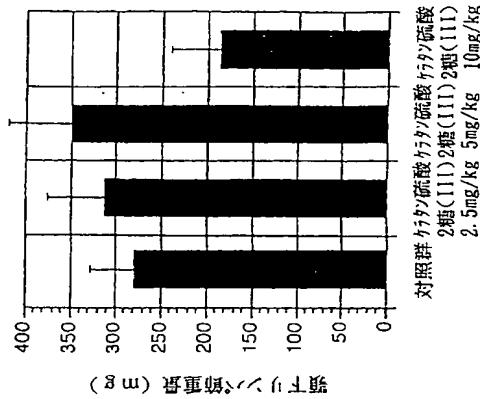


図15

[図1-5]

[図16]



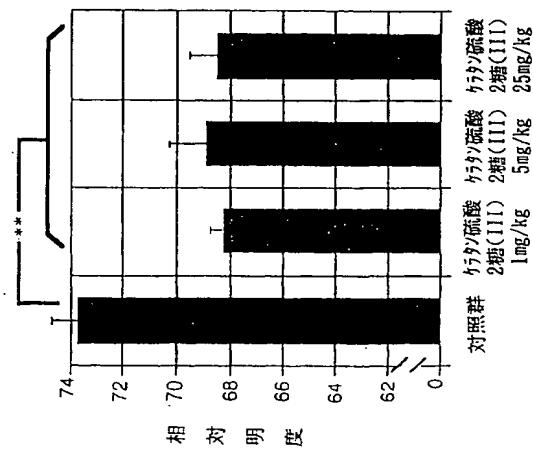
16

(63)

WO 96/16973

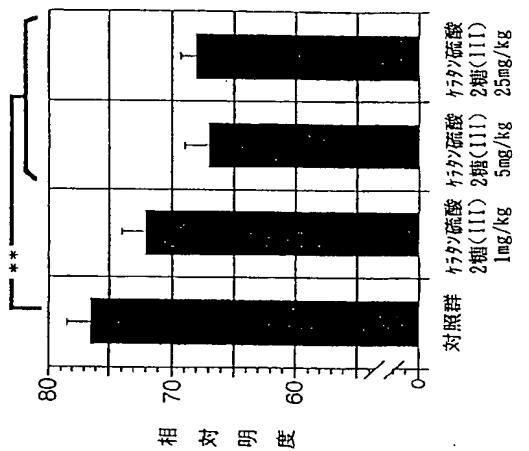
[図17]

図17



[図18]

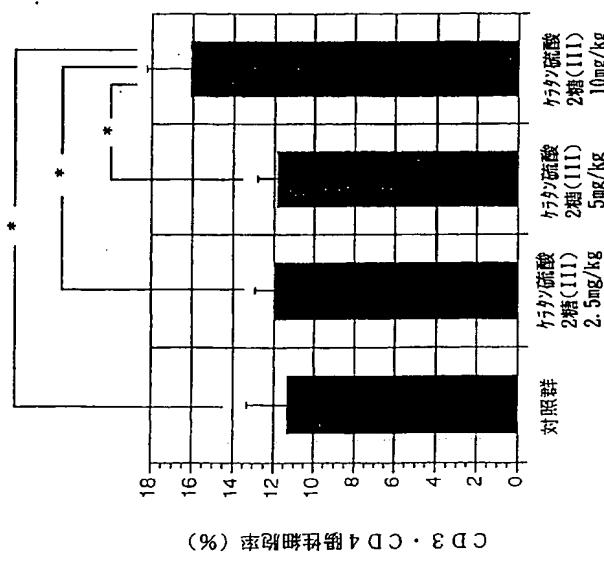
図18



(64)

WO 96/16973

[図19] 図19



[図20] 図20

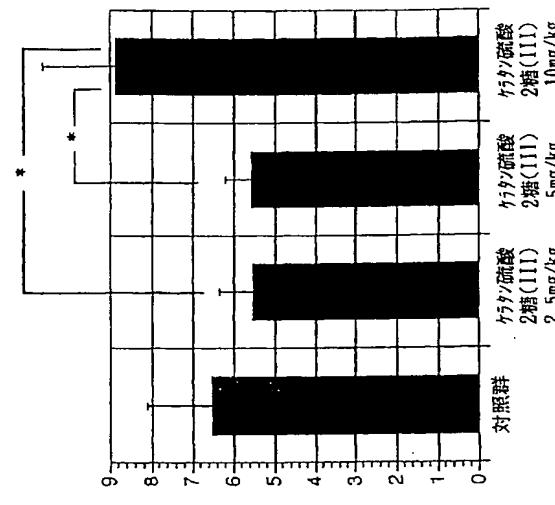
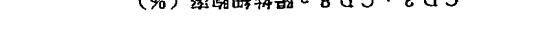
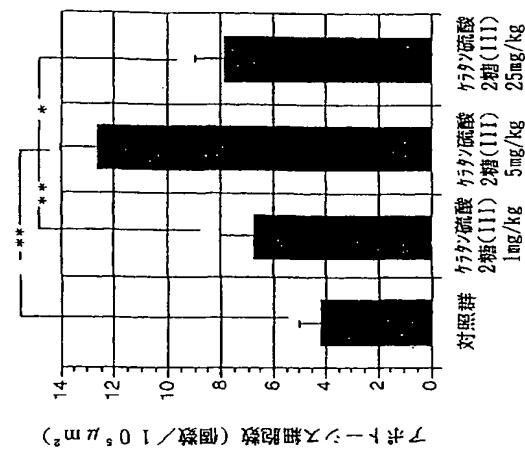
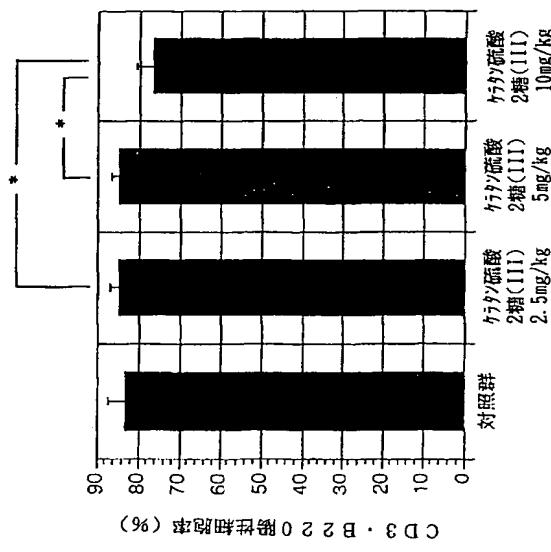


図21

図22



【国際調査報告】

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP 95/02386	フロントページの様式	
A. 発明の属する分野 (国際特許分類 (IPC))				
Int. CL [*] C07H 11/00, A61K 31/70		(72)発明者 吉田 基一 東京都東村山市恩多町4丁目14-12		
B. 国籍を行った分野		(72)発明者 渡利 光 埼玉県入間市仏子769-2-410		
C. 調査を行った県外(国際特許分類 (IPC))		(注) この公表は、国際事務局 (WIPO) により国際公開された公報を基に作成したものである。		
Int. CL [*] C07H 11/00, A61K 31/70		なおこの公表に係る日本特許庁出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本報道とは関係ありません。		
D. 国際調査で使用した電子データベースの名称、調査に使用した用語				
OAS ON LINE				
E. 開述すると思われる文献				
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が開述するときは、その開述する箇所の表示	請求の範囲の番号		
P, A	J.P. 7-278203, A (コラーゲン・コーガレーション), 24.10月, 1995 (24.10.95), 特許請求の範囲 B.P. 656215, A	1-3-2		
P, A	WO, 9428889, A (NEOGENIX, INC.), 22.12月, 1994 (22.12.94), O1alm 18&AU, 9472058, A	1-3-2		
<input type="checkbox"/> Cのときに文献が序章されている。 <input type="checkbox"/> パラントラミリーに関する別紙を参照。				
<p>*引用文献のカテゴリー</p> <p>(A) 特許文献ではなく、一般的情報を示すもの (E) 特許文献でもあるが、国際出願以後に公表された他の文献の行日 (I) 着手者主張に依拠する文書または他の文献の行日 若しくは他の特許理由を羅列するために引用する文書 (虚由を付す)</p> <p>(O) 国籍による明示、使用、表示等に及ぼす文書 (P) 国際出願日以前、かつ優先権の主張となる出願の日 の特許文献</p>				
国際調査を行った日 29.01.95		国際調査報告の年月 20.02.96		
名前及び住所 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (機関のある職員) 内 庫 伸 一	④ 〇 8 6 1 5	
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.